

~~BEST AVAILABLE COPY~~

EP 04 | 12556

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	21 DEC 2004
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 103 51 636.0

**Anmeldetag:** 05. November 2003

**Anmelder/Inhaber:** Dmitry Cherkassov, 23562 Lübeck/DE;  
Dr. Christian Hennig, 23562 Lübeck/DE;  
Genovoxx GmbH, 23562 Lübeck/DE.

**Bezeichnung:** Nukleotidverbindungen und deren Anwendung

**IPC:** C 07 H, C 12 P, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

**BEST AVAILABLE COPY**

München, den 2. Dezember 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
im Auftrag

Agurkis

## **1. Einführung**

### **1.1 Einordnung in das technologische Feld**

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Herstellung und die Verwendung modifizierter Nukleotid- und Nukleosidbausteine, im folgenden „Nuk-Makromoleküle“.

- 5 Oligo- oder Polynukleotide sind nur dann Gegenstand der Erfindung, wenn sie unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle entstanden sind.

### **1.2 Stand der Technik:**

Nukleotide und Nukleoside spielen eine zentrale Rolle in unterschiedlichen

- 10 Stoffwechselvorgängen der lebenden Organismen ("Biochemie und Pathobiochemie", G. Löffler, 2003) und stellen in der modernen Biotechnologie verbreitete Bausteine dar ("Molecular-Cloning", J. Sambrook, band 1-3, 2001, ISBN 0-87969-576-5), beispielsweise für künstliche Detektionssysteme ("DNA Microarrays", Bowtell, 2003, ISBN 0-87969-624-9, "Microarray-Biochip Technology" M Schena, 2000, ISBN 1-15 881299-37-6). Aus diesem Grund werden modifizierte Nukleotide, Nukleotid-Analoga, in unterschiedlichen Bereichen der Biotechnologie, Medizin und Pharmakologie eingesetzt ("Nucleotide Analogs" Scheit, 1980, ISBN 0-471-04854-2, "Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry", Kisakürek 2000, "Anti-HIV Nucleosides" Mitsuya, 1997; "Nucleoside Analogs in cancer therapy", Cheson, 1997).

- 20 Eines der wichtigsten Felder der modernen Life-Science sind Analysen der Nukleinsäuren. Ein großer Bereich dieser Analysen befasst sich mit dem Nachweis der Nukleinsäuren oder deren Bestandteilen im biologischen Präparat. In vielen Fällen wird zu diesem Zweck ein Reaktionspartner markiert, der mit der zu analysierenden Nukleinsäure reagieren kann. Dem Fachmann sind unterschiedliche Möglichkeiten zur Markierung der Nukleinsäuren bekannt. Einerseits können einzelne Nukleinsäurebausteine, Nukleotide bzw. Nukleoside modifiziert sein, andererseits können kurze Fragmente von Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder Polynukleotide zum Nachweis eingesetzt werden.

- 30 Konventionell modifizierte Nukleotide sind beispielsweise in Lee et al. Nucleic acid research 1992, V. 20, S.2471; Augustin et. al. J. Biotechnology 2001 V. 86, S.289-301; US Patent 4828979; Held et al. Nucleic acid research, 2002, v. 30, S. 3857 beschrieben. Diese Nukleotide haben einen niedermolekularen detektierbaren Teil, der 35 direkt (wie beispielsweise ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül) oder indirekt detektiert werden kann (wie beispielsweise bei einem Biotin-Molekül, das erst nach Kopplung mit einem Streptavidin-Farbstoff-Konjugat nachgewiesen wird). Solche Nukleotide stellen Beispiele für die Stand der Technik der Nukleotid-Modifikationen dar. Viele modifizierte

Nukleotide können kommerziell erworben werden, z.B. von NEN Life Science Products (Biotin-11-dUTP, DNP-11-dATP, Fluorescein-12-dCTP), von Amersham Bioscience (dCTP-Cy3, dCTP-Cy5) oder von Roche (Biotin-16-dUTP). Entsprechende

- 5 Nachweisreagenzien, z.B. markiertes Streptavidin, markierte Antikörper, können von den selben Anbietern bezogen werden. Auch modifizierte Nukleoside werden für den Nachweis von Nukleinsäuren eingesetzt (Trilink Biotechnologies, Eurogentec, MWG-Biotech).

Zur Vereinfachung der Darstellung werden im Folgenden modifizierte Nukleotide besprochen. Einem Fachmann sollte es naheliegend erscheinen, dass auch modifizierte  
10 Nukleoside für die enzymatische und nicht enzymatische Synthesen eingesetzt werden können, konventionell modifizierte Nukleoside sind erhältlich beispielsweise bei Trilink Biotechnologies oder Eurogentec.

Konventionell modifizierte Nukleotide haben ein äquimolares Verhältnis zwischen der Nukleotid-Komponente und dem niedermolekularen detektierbaren Teil, z.B. Farbstoff-Molekül bzw. Biotin-Molekül. Zwischen beiden Teilen liegt ein Linker mit einer durchschnittlichen Länge von 5 - 30 Atomen.

Solche Nukleotide können von Polymerasen in den wachsenden Strang eingebaut werden und somit ein signaltragendes Molekül (Farbstoff) oder signalvermittelndes Molekül (Biotin oder Digoxigenin) in die Nukleinsäurekette einführen. Nach dem  
20 Einbau von modifizierten Nukleotiden kann die Signaldetektion im Fall von farbstoffmarkierten NT direkt erfolgen oder nach Inkubation mit einem sekundären signaltragenden Molekül (z.B. Streptavidin-Farbstoff-Konjugat im Fall von Biotin), wenn signalvermittelnde Moleküle verwendet werden. Die nachträgliche Kopplung der signaltragenden Moleküle, wie Streptavidin, erfolgt oft mit unzureichenden Ausbeuten von 20-60%.

Sehr oft werden bei der Markierung der Nukleinsäuren Signalvervielfältigungsschritte eingesetzt. Diese können auf unterschiedlichen Stufen der Analyse durchgeführt werden. Beispiele dafür stellen Materialvervielfältigung (PCR), mehrfacher Einbau von  
30 markierten Nukleotiden, mehrstufige nachträgliche Markierung von Biotin-Nukleotiden ("Molecular-Cloning", J. Sambrook, Band 1-3, 2001, ISBN 0-87969-576-5). Diese Verfahren führen zu einer Verzerrung der Signale, da sie aus mehreren, oft ungenügend kontrollierten Schritten bestehen, die mit unterschiedlichen Ausbeuten ablaufen und von vielen Faktoren beeinflusst werden können.

35

Die gewünschte und für den Fachmann naheliegende Signalverstärkung durch eine mehrfache Markierung eines Nukleotids bereits während der Nukleotid-Synthese erweist sich in Kombination mit herkömmlichen Nukleotidstrukturen als sehr großer

Nachteil. Zwar können solche Nukleotide ohne größeren Aufwand hergestellt werden (Beispiel 25), verlieren aber ihre Funktion als Substrat für Polymerasen (Beispiel 34B) und andere Enzyme. Die Ursache dafür liegt in der Veränderung der Eigenschaften der Nukleotide in Folge der Kopplung an ein wesentlich größeres Molekül.

5

Bestimmte Verfahren, beschrieben beispielsweise in Seeger WO 0018956, Kartalov WO 002072892, sind auf die Detektion der Signale von einzelnen Nukleotid-Molekülen angewiesen. Beim Einsatz konventioneller Nukleotide beeinflussen mehrere Phänomene wie z.B. das Ausbleichen der Farbstoffe oder Blinking die Ergebnisse der 10 Einzelmoleküldetektion. Für solche Verfahren bedeutet eine Steigerung von Signalstärke und Intensität der Nukleotidmarkierung eine Verringerung der Fehlerrate bei der Detektion.

15

Kopplung von stärkeren signalgebenden oder signalvermittelnden Elementen an Nukleotide, beispielsweise durch eine multiple Markierung von Nukleotiden mit mehreren Farbstoffen, würde einen großen Vorteil für viele Verfahren auf dem Gebiet der Nukleinsäureanalyse bedeuten.

20

Die vorliegende Erfindung beseitigt die Nachteile des Standes der Technik und beschreibt eine neue Klasse an modifizierten Nukleotiden, die Nuk-Makromoleküle. Nuk-Makromoleküle sind dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Nuk-Komponenten mit einem oder mehreren signalgebenden oder signalvermittelnden makromolekularen Komponenten (Marker) verbunden sind. Die jeweilige Nuk-Komponente bewahrt in einem Nuk-Makromolekül seine Substratfunktion und kann 25 z.B. durch Polymerasen in einen wachsenden Strang eingebaut werden. Eine signalgebende makromolekulare Komponente trägt beispielsweise mehrere Farbstoffmoleküle.

30

Nuk-Makromoleküle können wie konventionell modifizierte Nukleotide in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie und Medizin verwendet werden. Im Folgenden sollte lediglich als Beispiel deren Einsatz für die Nukleinsäuremarkierung dargestellt werden. Andere Einsatzbereiche der Nuk-Makromoleküle sind dem Fachmann bereits bekannt s.o.

35

**1.3 Begriffe / Definitionen:**

**1.3.1. Makromolekulare Verbindung** - ein Molekül, ein Molekülkomplex, ein Nanokristall oder Nanoteilchen, dessen Masse zwischen 2kDa und 100kDa, 100kDa und 200kDa, 200kDa und 1000kDa oder 1MDa und 100MDa oder 100 MDa und 100GDa liegt. Beispiele für makromolekulare Verbindungen sind Nukleinsäuren, wie Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als 10 Nukleotiden, Polynukleotide, Polypeptide, Proteine oder Enzyme, Quantum Dots, Polymere wie PEG, Mowiol, Polyacrylat, Nanogold-Partikel.

10

**1.3.2. Niedermolekulare Verbindung** - ein Molekül oder ein Molekülkomplex, dessen Masse kleiner 2000 Da (2kDa) beträgt, z.B. natürliche Nukleotide, dATP, dUTP, viele Farbstoffe, wie Cy3, Rhodamine, Fluorescein, Linker mit einer durchschnittlichen Länge zwischen 5 und 30 Atomen, seltene Erden und konventionell modifizierte Nukleotide, wie Biotin-16-dUTP.

15

**1.3.3. Ein Nuk-Makromolekül** im Sinne dieser Anmeldung ist eine chemische Struktur, die eine oder mehrere Nuk-Komponenten, eine oder mehrere Linker-Komponenten und eine Marker-Komponente hat, Fig. 1 oder 2:

20

(Nuk-Linker)<sub>n</sub>-Marker

wobei:

- |        |  |
|--------|--|
| Nuk    | - eine Nuk-Komponente ist                |
| Linker | - eine Linker-Komponente ist             |
| Marker | - eine Makrer-Komponente ist             |
| n      | - eine ganze Zahl zwischen 1 und 100 ist |

25

In bevorzugter Ausführungsform besteht die Linker-Komponente aus einer Kopplungseinheit L für die Kopplung des Linkers an die Nuk-Komponente, aus einem wasserlöslichen Polymer und aus einer Kopplungseinheit T für die Kopplung des Linkers an die Marker-Komponente. In dieser bevorzugten Ausführungsform hat ein Nuk-Makromolekül folgende Struktur, Fig. 1 oder 2:

35

(Nuk-L- Polymer-T)<sub>n</sub>-Marker

wobei:

- Nuk - ein Nukleotid oder ein Nukleosid ist (Nuk-Komponente)

- L - ein Teil des Linkers ist, das die Verbindung zwischen Nuk und dem Linkerrest darstellt (Kopplungseinheit L)
- T - ein Teil des Linkers ist, das die Verbindung zwischen dem Linkerrest und dem Marker darstellt (Kopplungseinheit T)
- 5 Polymer - ein Teil des Linkers ist, das ein wasserlösliches Polymer mit einer durchschnittlichen Länge zwischen 100 und 10.000 Atome ist  
(Kopplungseinheit L, Polymerlinker, Kopplungseinheit T sind bei dieser Ausführungsform als Linker-Komponente zusammengefaßt)
- Marker - eine Marker-Komponente
- 10 n - eine ganze Zahl zwischen 1 und 100

Nuk-Makromoleküle sind durch eine Kombination aus einer oder mehreren Nuk-Komponenten, entsprechend einem oder mehreren langen Linker-Komponenten und einer Marker-Komponente definiert.

15

### **1.3.3.1 Nuk-Komponente**

- Nuk-Komponente kann sowohl ein Nukleotid als auch ein Nukleosid darstellen. Im folgenden werden bei der Beschreibung Nukleotide betrachtet. Einem Fachmann sollte es naheliegend erscheinen, daß auch Nukleoside in entsprechender Weise 20 modifiziert und in entsprechenden Reaktionen werden können. Prinzipiell können alle als Substrat für Nukleotid-akzeptierende Enzyme geeigneten konventionellen Nukleotid-Varianten als Nuk- Komponente des Nuk-Makromoleküls dienen, so daß sowohl natürliche als auch modifizierte Nukleotide (Nukleotid-Analoga) für die Nuk-Komponente in Frage kommen. Bei modifizierten Nukleotiden können Base-, Zucker- oder Phosphat-Teile modifiziert werden, Fig. 3. Viele Beispiele für Nukleotid-25 Modifikationen sind dem Fachmann bekannt ("Advanced organic chemistry of nucleic acids", 1994, Shabarova, ISBN 3-527-29021-4, "Nucleotide Analogs" Scheit, 1980, ISBN 0-471-04854-2, "Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry", Kisakürek 2000, "Anti-HIV Nucleosides" Mitsuya, 1997, "Nucleoside Analogs in cancer therapy", Cheson, 30 1997) im Text werden auch weitere Beispiele für die Modifikationen der Nukleotide angegeben.

Die Nuk-Komponente hat vorzugsweise eine Base-Komponente (Base), eine Zucker-Komponente (Zucker) und eine Phosphat-Komponente (Phosphat).

35 **1.3.3.1.1 Variationen am Phosphat**

In einer Ausführungsform stellt die Nuk-Komponente ein Nukleosid dar. In einer anderen Ausführungsform stellt die Nuk-Komponente ein Nukleosid-Monophosphat dar. In einer anderen Ausführungsform stellt die Nuk-Komponente ein Nukleosid-

Diphosphat dar. In einer weiteren Ausführungsform stellt die Nuk-Komponente ein Nukleosid-Triphosphat dar. Auch höhere Phosphat-Derivate (Tetraphosphat usw.) können verwendet werden.

Die genannten Phosphatmodifikationen können wie bei natürlichen Nukleosid-

- 5 Triphosphaten an der 5'-Position oder auch an anderen Positionen des Zucker-Teils des Nukleotides sitzen, beispielsweise an 3'-Position.

#### **1.3.3.1.2 Variationen an der Base**

Die Nuk-Komponente kann ein in der Natur in den Nukleinsäuren vorkommendes

- 10 Nukleotid darstellen (mit einer der Basen Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin, Uracil, Inosin), oder eine modifizierte Base, wie z.B. 7-Deazaadenin, 6-Thio-adenin, enthalten, Literatur s. oben..

#### **1.3.3.1.3 Variationen am Zucker**

- 15 Sowohl Ribose als auch 2'-Deoxyribose oder 2',3'-Dideoxyribose können das Grundgerüst der Nuk-Komponenten bilden. Auch am 3'-Hydroxyl modifizierte Ribose, bzw. 2'-deoxyribose können eingesetzt werden.

#### **1.3.3.1.4 Kopplung von NT und Linker**

- 20 Die Nuk-Komponente ist an einer Kopplungsstelle mit dem Linker verbunden. Die Kopplungsstelle des Linkers an die Nuk-Komponente kann sich an der Base, am Zucker (Ribose bzw. Deoxyribose), oder am Phosphat-Teil befinden.

25 Die Verbindung zwischen der Linker-Komponente und der Nuk-Komponente ist vorzugsweise kovalent.

Wenn die Kopplungsstelle an der Base liegt, so befindet sie sich vorzugsweise an den Positionen 4 oder 5 bei Pyrimidin-Basen und an den Positionen 6,7,8 bei den Purin-Basen. Am Zucker können die Positionen 2', 3', 4' oder 5' die Kopplungsstellen darstellen. Die Kopplung an die Phosphatgruppen kann an der alpha, beta, oder

- 30 gamma-Phosphatgruppe erfolgen. Beispiele für die Kopplungsstelle an der Base sind in Short WO 9949082, Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382 (siehe auch kommerziell erhältliche Nukleotide (Amersham, Roche), an der Ribose in Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta, 1994, V. 77, S. 586, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363, Canard US. Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 35 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642., an Phosphatgruppen in Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363 beschrieben.

Die Position der Kopplungsstelle hängt vom Einsatzgebiet der NT-Makromoleküle ab. So werden beispielsweise für die Markierung von Nukleinsäuren, die am Nukleinsäurestrang verbleiben soll, vorzugsweise Kopplungsstellen am Zucker oder an der Base verwendet. Die Kopplung an die Gamma- oder Beta-Phosphatgruppen kann 5 beispielsweise dann erfolgen, wenn die Markierung beim Einbau des Nuk-Makromoleküls freigesetzt werden soll.

Die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente erfolgt über eine Kopplungseinheit (L), die ein Teil der Linker-Komponente ist.

10

Die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und dem Linker kann in einer Ausführungsform widerstandsfähig sein, z.B. bei Temperaturen bis zu 130°C, für pH-Bereiche zwischen 1 und 14, und/oder resistent gegen hydrolytische Enzyme (z.B. Proteasen, Esterasen) sein. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist die 15 Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und dem Linker unter milden Bedingungen spaltbar.

Diese spaltbare Verbindung ermöglicht die Entfernung der Linker- und der Marker-Komponenten. Dies kann beispielsweise in den Verfahren der Sequenzierung durch die 20 Synthese von Bedeutung sein, wie Pyrosequencing, BASS (Canard et al. US Patent 5.798.210, Rasolonjatovo Nucleosides & Nucleotides 1999, V.18 S.1021, Metzker et al. NAR 1994, V.22, S.4259, Welch et al. Nucleosides & Nucleotides 1999, V.18, S.19) oder single molecule sequencing, Tcherkassov WO 02088382. Ihre Wahl ist nicht eingeschränkt, sofern sie unter den Bedingungen der enzymatischen Reaktion stabil 25 bleibt, keine irreversible Störung der Enzyme (z.B. Polymerase) verursacht und unter milden Bedingungen abgespalten werden kann. Unter "milden Bedingungen" sind solche Bedingungen zu verstehen, die zum Beispiel Nukleinsäure-Primer-Komplexe nicht zerstören, wobei z.B. der pH-Wert vorzugsweise zwischen 3 und 11 und die Temperatur zwischen 0°C und einem Temperaturwert (x) liegt. Dieser Temperaturwert (x) hängt von 30 der Tm des Nukleinsäure-Primer-Komplexes (Tm ist der Schmelzpunkt) und wird beispielsweise als Tm (Nukleinsäure-Primer-Komplex) minus 5°C errechnet (z.B. Tm ist 47°C, dann liegt die maximale Temperatur bei 42°C; unter diesen Bedingungen eignen sich besonders Ester-, Thioester-, Acetale, Phosphoester-, Disulfid-Verbindungen und photolabile Verbindungen als spaltbare Verbindungen).

35

Vorzugsweise gehört die genannte spaltbare Verbindung zu chemisch oder enzymatisch spaltbaren oder photolabilen Verbindungen. Als Beispiele von chemisch spaltbaren Gruppen sind Ester-, Thioester-, Disulfid-, Acetal-Verbindungen bevorzugt (Short WO

9949082, „Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993 CRC Press Inc., Herman et al. Method in Enzymology 1990 V.184 S.584, Lomant et al. J.Mol.Biol. 1976 V.104 243, "Chemistry of carboxylic acid and esters" S.Patai 1969 Interscience Publ.). Beispiele für photolabile Verbindungen können in folgenden Literaturstellen gefunden werden: Rothschild WO 9531429, "Protective groups in organic synthesis" 1991 John Wiley & Sons, Inc., V. Pillai Synthesis 1980 S.1, V. Pillai Org. Photochem. 1987 V.9 S.225, Dissertation „Neue photolabile Schutzgruppen für die lichtgesteuerte Oligonucleotidsynthese“ H.Giegrich, 1996, Konstanz, Dissertation „Neue photolabile Schutzgruppen für die lichtgesteuerte Oligonucleotidsynthese“ S.M.Bühler, 10 1999, Konstanz)..

#### **1.3.3.1.5 Zahl der gekoppelten Nuk-Komponenten**

In einer Ausführungsform der Erfindung ist pro ein Nuk-Makromolekül nur eine Nuk-Komponente gekoppelt. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung sind mehrere Nuk- Komponenten pro Nuk-Makromolekül gekoppelt. Mehrere Nuk-Komponenten können einheitlich oder unterschiedlich sein, wobei beispielsweise durchschnittlich 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 25, 25 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 250, 250 bis 500, 500 bis 1000 Nuk-Komponenten pro ein Nuk-Makromolekül gekoppelt sein können.

20

#### **1.3.3.2 Linker-Komponente** Die Bezeichnung Linker oder Linker-Komponente wird synonym in der Anmeldung verwendet und bezieht sich auf den gesamten strukturellen Abschnitt des Nuk-Makromoleküls zwischen der Nuk-Komponente und der Marker-Komponente.

25

##### **1.3.3.2.1 Linker-Bestandteile**

Die Linker-Komponente stellt einen Teil des Nuk-Makromoleküls dar, das zwischen der jeweiligen Nuk-Komponente und der Marker-Komponente liegt. Die Linker-Komponente hat in ihrer Struktur vorzugsweise folgende Bestandteile:

- 30 1) Kopplungseinheit L
- 2) wasserlösliches Polymer
- 3) Kopplungseinheit T

Die Aufteilung der Linker-Komponente in einzelne Bestandteile ist rein funktionell und soll lediglich der Anschaulichkeit der Struktur dienen. Je nach Betrachtungsweise können einzelne Strukturen des Linkers zum einen oder zum anderen funktionellen Bestandteil gerechnet werden.

Die Kopplungseinheit L hat die Funktion, die Linker-Komponente und die Nuk-Komponente zu verbinden. Ihre Struktur ist nicht eingeschränkt, solange das Nuk-Makromolekül als Substrat von den Enzymen akzeptiert wird. Bevorzugt sind kurze, unverzweigte Verbindungen, bis max. 20 Atome in der Länge. Die jeweilige Struktur

- 5 der Kopplungseinheit L hängt von der Kopplungsstelle des Linkers an das Nukleotid und von dem jeweiligen Polymer des Linkers. Einige Beispiele für die Kopplungseinheiten L sind in Beispielen 1 bis 33 angegeben. Viele konventionell modifizierte Nukleotide tragen einen kurzen Linker, diese kurzen Linker dienen als weitere Beispiele für die Kopplungseinheit L, z.B. kurze Linker an der Base: Short WO  
 10 9949082, Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382(siehe auch kommerziell erhältliche Nukleotide (Amersham, Roche), kurze Linker an der Ribose in Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta, 1994, V. 77, S. 586, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363, Canard US. Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642., kurze Linker an Phosphatgruppen in Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363 .  
 15 Noch weitere Beispiele für die Kopplungseinheit L sind nachfolgend angegeben:

- 20  $R_6-NH-R_7, R_6-O-R_7, R_6-S-R_7, R_6-SS-R_7, R_6-CO-NH-R_7, R_6-NH-CO-R_7, R_6-CO-O-R_7,$   
 $R_6-O-CO-R_7, R_6-CO-S-R_7, R_6-S-CO-R_7, R_6-P(O)_2-R_7, R_6-Si-R_7, R_6-(CH_2)_n-R_7,$   
 $R_6-(CH_2)_n-R_7, R_6-A-(CH_2)_n-R_7, R_6-(CH_2)_n-B-R_7,$   
 $R_6-(CH=CH-)_n-R_7, R_6-(A-CH=CH-)_n-R_7, R_6-(CH=CH-B-)_n-R_7,$   
 $R_6-A-CH=CH-(CH_2)_n-R_7, R_6-(-CH=CH-CH_2)_n-B-R_7,$   
 $R_6-(C\equiv C-)_n-R_7, R_6-(A-C\equiv C-)_n-R_7, R_6-(C\equiv C-B-)_n-R_7,$   
 $R_6-A-C\equiv C-(CH_2)_n-R_7, R_6-(-C\equiv C-CH_2)_n-B-R_7,$

- 25 wobei  $R_6$  - die Nuk-Komponente ist,  $R_7$  - de Polymer ist und A und B folgende strukturelle Elemente einschließen:  $-NH-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-SS-$ ,  $-CO-NH-$ ,  $-NH-CO-$ ,  $-CO-O-$ ,  $-O-CO-$ ,  $-CO-S-$ ,  $-S-CO-$ ,  $-P(O)_2-$ ,  $-Si-$ ,  $-(CH_2)_n-$ , eine photolabile Gruppe, wobei n - gleich 1 bis 5 ist  
 30 Die Kopplungseinheit L ist auf einer Seite mit der Nuk-Komponente, auf der anderen mit Polymer kovalent verbunden. Die Art der Kopplung hängt von der Art des Polymers ab. In bevorzugter Form hat das Polymer an seinen Enden reaktive Gruppen, beispielsweise NH<sub>2</sub> (Amino), OH (Hydroxy), SH (Mercapto), COOH (Carboxy), CHO (Aldehyd), Acryl- oder Maleimid, Halogen-Gruppen. Solche Polymere sind käuflich  
 35 erwerblich (z.B. Fluka). Einige Varianten für die Kopplung von Polymeren an die Kopplungseinheiten sind unter Beispielen 1 bis 33 angegeben.

Das wasserlösliche Polymer bildet in einer bevorzugten Ausführungsform den Hauptanteil der Linker-Komponente. Es ist ein Polymer, vorzugsweise hydrophil, bestehend aus gleichen oder unterschiedlichen Monomeren. Beispiele für geeignete Polymere stellen Polyethylen-glycol (PEG), Polysaccharide, Polyamide (z.B.

- 5 Polypeptide), Polyphosphate, Polyacetate, Poly(alkyleneglycole), Kopolymere aus Ethylenglycol und Propylenglycol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone), Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(x-Hydroxy-Säuren), Poly-Acrylsäure und ihre Derivate, Poly-Acrylamide in ihre derivate, Poly(Vinylalkohol), Polylactat Säure, polyglycolic Säure, Poly(epsilon-caprolactone),
- 10 Poly(beta-hydroxybutyrate), Poly(beta-hydroxyvalerate), Polydioxanone, Poly(ethylene terephthalate), Poly(malic Säure), Poly(tartronic Säure), Poly(ortho ester), Polyanhydride, Polycyanoacrylate, Poly(phosphoester), Polyphosphazene, Hyaluronidate, Polysulfones.

- 15 Dieses Polymer kann verzweigt sein oder nicht. Dieses Polymer kann aus mehreren unterschiedlich langen Abschnitten bestehen, wobei jeder Abschnitt aus gleichen Monomeren besteht und Monomere in unterschiedlichen Abschnitten unterschiedlich sind. Einem Fachmann sollte naheliegend erscheinen, daß für einen makromolekularen Linker meistens nur eine durchschnittliche Masse bestimmt werden kann, so daß die
- 20 Angaben zu den Molmassen einen Mittelwert darstellen ("Makromoleküle, Chemische Struktur und Synthesen", Band 1, 4, H. Elias, 1999, ISBN 3-527-29872-X). Aus diesem Grund kann für Nuk-Makromoleküle keine exakte Massenangabe gemacht werden.

### 25 1.3.3.2.2 Linker-Länge

Die Linkerlänge beträgt zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 10.000, 10000 bis 100000 Atome, somit beträgt die durchschnittliche Linker-Länge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 10.000, 10000 bis 100000 Angström (gemessen an

- 30 einem potenziell maximal ausgestrecktem Molekül).

Einige Abschnitte des Linkers können rigide Bereiche enthalten und andere Abschnitte können flexible Bereiche enthalten.

- 35 Es wird einem Fachmann naheliegend erscheinen, daß die angeführten Linker-Längen eine beträchtlich größere Molekül-Größe und -Masse haben können, als die jeweilige Nuk-Komponente selbst.

### **1.3.3.2.3 Linker-Kopplung in einem Nuk-Makromolekül**

Der Linker ist an einer Seite an die Nuk-Komponente und auf der anderen Seite an die Marker-Komponente gebunden. Dazu hat der Linker an seinen Enden Kopplungseinheiten, die diese Funktion erfüllen. Die Verbindung mit der Nuk-

- 5 Komponenten wurde oben erörtert. Die Verbindung zwischen dem Linker und der Marker-Komponenten erfolgt über Kopplungseinheit T. Ihre Struktur ist nicht eingeschränkt, solange das Nuk-Makromolekül als Substrat von den Enzymen akzeptiert wird. Bevorzugt sind kurze, unverzweigte Verbindungen, bis max. 20 Atome in der Länge. Die jeweilige Struktur der Kopplungseinheit T hängt von der
- 10 Kopplungsstelle an der Marker-Komponente und von dem jeweiligen Polymer des Linkers. Die Kopplungseinheit T ist mit dem Polymer kovalent verbunden. Die Art der Kopplung hängt von der Art des Polymers ab. In bevorzugter Form hat das Polymer an seinen Enden reaktive Gruppen, beispielsweise NH<sub>2</sub> (Amino), OH (Hydroxy), SH (Mercapto), COOH (Carboxy), CHO (Aldehyd), Acryl- oder Maleimid, Halogen-Gruppen.
- 15 Solche Polymere sind kommerziell erhältlich (z.B. Fluka). Einige Beispiele für die Kopplungseinheiten L sind in Beispielen 1 bis 33 angegeben, Weitere Beispiele für die chemische und affine Kopplungen s. in der Literatur: „Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993, "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996.

20

Der Linker kann auch andere funktionelle Gruppen, bzw. Abschnitte enthalten, beispielsweise eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Gruppen (Fig.9), ein oder Farbstoffmoleküle, s. Beispiele 22, 23, 24, 31.

25

Eine spaltbare Verbindung innerhalb des Linkers ermöglicht eine Entfernung eines Teils des Linkers und der Marker-Komponente. Nach der Spaltung verbleibt ein Linker-Rest an der Nuk-Komponente, Beispiele für spaltbare Verbindungen sind im Abschnitt 1.3.3.1.4 angegeben.

30

### **1.3.3.3 Marker-Komponente**

Die Marker-Komponente kann unterschiedliche Strukturen haben. Die Strukturen im einzelnen sind nicht eingeschränkt, solange sie die Substrateigenschaften der Nuk-Komponenten für Enzyme nicht komplett aufheben. Diese Struktur hat vorzugsweise eine signalgebende oder eine signalvermittelnde Funktion. Der Marker kann auch andere Funktionen haben, beispielsweise strukturielle, antitoxische oder affine Funktion (beispielsweise in Arzneimittel oder Zuberungen).

### **1.3.3.3.1 Die Zusammensetzung der Marker-Komponente**

Der Marker kann aus einem Makromolekül bestehen (Fig. 4a) oder aus einer Gruppe gleicher oder unterschiedlicher struktureller Einheiten (Marker-Einheiten) mit signalgebender oder signalvermittelnder Funktion. Diese Einheiten können Moleküle

- 5 mit geringer Molekularmasse, z.B. unter 2000 Da, oder auch selbst Makromoleküle sein. Dabei liegt die Zahl der signalgebenden oder signalvermittelnden Einheiten, die zu einer Marker-Komponenten zusammengefaßt sind, zwischen 1 und 2, 2 und 5, 5 und 20, 20 und 50, 50 und 100, 100 und 500, 500 und 1000. Die Einheiten sind an ein makromolekulares Gerüst gebunden, der Kern-Komponenten des Markers (Fig.
- 10 4b,c). Diese Kern-Komponente verbindet die Einheiten untereinander und stellt die Verbindung zu einem oder mehreren Nuk-Linker-Komponenten her (Fig 5).

### **1.3.3.3.2 Struktur der signalgebenden oder der signalvermittelnden Einheiten des Markers**

- 15 Die strukturellen Marker-Einheiten können aus folgenden Gruppen gewählt werden:

#### **1.3.3.3.2.1 Strukturen mit niedriger Molmasse:**

Biotin-Moleküle, Hapten-Moleküle (z.B. Digoxigenin), radioaktive Isotope (z.B. P <sup>32</sup>, J <sup>131</sup>), oder deren Verbindungen, seltene Erden , Farbstoffe, Fluoreszenzfarbstoffe (s. 20 z.B. Molecular Probes) mit gleichen oder unterschiedlichen spektralen Eigenschaften, Farbstoffe, die untereinander FRET eingehen.

Auch chemisch reaktive Gruppen, wie beispielsweise Amino-, Merkapto-, Aldehyd-, Jodacetat-, Acryl-, Dithio-, Thioester-Verbindungen können als signalvermittelnde 25 strukturelle Einheiten dienen (Fig. 6a). Nach dem Einbau können diese reaktiven Gruppen mit signalgebenden Elementen, wie beispielsweise Farbstoffe mit entsprechenden reaktiven Gruppen (beispielsweise NHS-Ester, Merkapto-, Amino-Gruppen) modifiziert werden (Fig. 6b). Die Grundlagen für die Wahl eines passenden 30 Paars sind in „Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993 dargestellt.

In einer speziellen Ausführungsform erfährt die Kombination aus einer markomolekularen Linker-Komponente und einer Struktur mit niedriger Molmasse bereits die Anforderungen der vorliegenden Erfindung. Solche Verbindungen sind 35 ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung, da sie sowohl als Zwischenprodukte für die chemische Synthese von Nuk-Makromolekülen mit einem makromolekularen Marker als auch selbstständig in den enzymatischen Reaktionen verwendet werden können. Beispiel einer solchen Verbindung ist dUTP-PEG-Biotin, Beispiel 19.

### **1.3.3.3.2.2 Strukturen mit hoher Masse (Makromoleküle)**

#### **1.3.3.3.2.2.1 Nanokristalle, z.B. Quantum Dots. Dabei können in einer Marker-**

- 5 Komponente Quantum Dots mit gleichen oder unterschiedlichen spektralen Eigenschaften verwendet werden, US Pat. 6.322.901, US Pat. 6.423.551, US Pat. 6.251.303, US Pat. 5.990.479).

#### **1.3.3.3.2.2.2 Nano oder Mikro-Teilchen, wobei die größten Ausmaße dieser**

- 10 Teilchen von 1nm bis 2nm, von 2nm bis 5nm, von 5nm bis 10nm, von 10nm bis 20 nm, von 20nm bis 50nm, von 50nm bis 100nm, von 100 nm bis 200nm, von 200nm bis 500nm, von 500nm bis 1000nm, von 1000 nm bis 5000 nm betragen. Das Material der Teilchen können beispielsweise reine Metalle wie Gold, Silber, Aluminium (beispielsweise Teilchen mit surface plasmon resonance ), - Protein-Au-Konjugate: J. Anal.Chem. 1998, V. 70,S. 5177, - Nukleinsäure-Au-Konjugaten: J. Am. Chem. Soc. 2001, V. 123, S.5164, J. Am. Chem. Soc. 2000, V. 122, S. 9071 , Biochem. Biophys. Res. Commun 2000, V. 274, S. 817, Anal. Chem. 2001, V. 73, S. 4450), - Latex (z.B. Latex-Nanopartikel, Anal. Chem. 2000,V. 72, S. 1979) - Kunststoff (Polystyrene), - paramagnetische Verbindungen / Gemische Zhi ZL et al. Anal Biochem. 2003 Jul 15;318(2):236-43, Dressman D et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 22;100(15):8817-22,, - Metall-Teilchen, - magnetische Verbindungen / Gemische Jain KK. Expert Rev Mol Diagn. 2003 Mar;3(2):153-61, Patolsky F et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2003 May 30;42(21):2372-2376, Zhao X et al. Anal Chem. 2003 Jul 15;75(14):3144-51, Xu H et al. J Biomed Mater Res. 2003 Sep 15;66A(4):870-9, JOSEPHSON Lee et al. US2003092029, KLICHE KAY-OLIVER et al. WO0119405.

#### **1.3.3.3.2.2.3 Proteinmoleküle,**

aus folgenden Gruppen: Enzyme (z.B. Peroxidase, alkalische Phosphatase, Urease, beta-Galaktosidase), - fluoreszierenden Proteine (z.B. GFP ), Antigen-bindende

- 30 Proteine (z.B. Antikörper, Tetramere, Affibodies (Nord et. Al Nature Biotechnology, V. 15 (S.772-777) oder deren Bestandteile (z.B. Fab-Fragmente), Nukleinsäurebindende Proteine (z.B. Transcriptionsfaktor)

#### **1.3.3.3.2.2.4 Nukleinsäureketten,**

- 35 die Nukleinsäureketten einschließlich der Gruppe, Oligonukleotide, modifizierte Oligonukleotide, wobei die Nukleinsäureketten eine Länge von 10 bis 20, von 20 bis 50, von 50 bis 100, von 100 bis 200, von 200 bis 500, von 500 bis 1000, 1000 bis 5.000, von 5.000 bis 10.000, von 10.000 bis 100.000 Nukleotiden haben. Es können

DNA, RNA, PNA-Moleküle verwendet werden. Nukleinsäureketten können zusätzliche Modifikationen tragen, wie beispielsweise freie Aminogruppen, Farbstoffe und andere signalgebende Moleküle, z.B. makromolekulare Stoffe, wie Enzyme oder Nanokristalle (Fig. 7a,c)(MWG-Biotech).

5

Weitere Beispiele für Makromoleküle oder Makromolekülkomplexe, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Einheiten in der Marker-Komponente für die Signalverstärkung eingesetzt werden können, sind in US 4882269, US 4687732, WO 8903849, US 6017707 beschrieben.

10

### **1.3.3.3 Die Kern-Komponente der Marker-Komponente**

Die Kernkomponente hat die Funktion mehrere strukturelle Elemente der Nuk-Makromoleküle zu binden. Vorzugsweise werden mehrere Nuk-Linker-Komponenten oder mehrere Marker-Einheiten an die Kernkomponente gekoppelt, s. Fig. 5.

15

#### **1.3.3.3.1 Bestandteile**

In einer Ausführungsform besteht die Kern-Komponente aus einem wasserlöslichen Polymer, dabei kann das Polymer aus gleichen oder unterschiedlichen Monomeren bestehen.

20

Beispiele für den Kernteil-Komponennte stellen Derivate folgender Polymere: Polyamide (z.B. Polypeptide), Poly-Acrylicsäure, Poly-Acrylamide, Poly-Vinylalkohole, Nukleinsäuren, Proteinen.. Diese Polymere können linear, globulär, z.B. Streptavidin oder Avidin, oder verzweigt sein, z.B. Dendrimere (Fig. 8a). Auch vernetzte lösliche Polymere, wie beispielsweise vernetzte Poly-Acrylamide (Crosslinker Bisacrylamid in Kombination mit Poly-Acrylamid), eingesetzt werden.

30

Die Kern-Komponennte hat mehrere Kopplungsstellen, an die weitere Elemente gebunden werden können, z.B. strukturelle Marker-Einheiten oder Nuk-Linker-Komponente.

Beispielsweise Poly-Lysin-Moleküle haben multiple freie Aminogruppen, an die mehrere Farbstoffmoleküle, Biotinmoleküle, Haptenmoleküle oder Nukleinsäureketten gekoppelt werden können. Poly-Lysine haben unterschiedliche Molmasse, z.B. 1000-2000, 2000-10000, 10000-50000 Da können käuflich erworben werden.

35

Als weiteres Beispiel für die Kernkomponente dienen Nukleinsäurenstränge, wobei die Nukleinsäureketten eine Länge von 10 bis 20, von 20 bis 50, von 50 bis 100, von 100 bis 200, von 200 bis 500, von 500 bis 1000, 1000 bis 5000, von 5000 bis 10000

Nukleotiden haben. Diese Nukleinsäuren dienen als Bindungspartner für sequenzkomplementäre Markereinheiten (Fig. 7b).

In einer weiteren Ausführungsform besteht die Kern-Komponente aus einem

- 5 Dendrimer, z.B. Polypropylenimine, Polyaminoamine. Beispiele für andere Dendrimere sind bekannt: Cientifica "Dendrimers", 2003, Technology white papers Nr. 6, Klajnert et al. Acta Biochimica Polonica, 2001, v. 48, S. 199, Manduchi et al. Physiol. Genomics 2002, V.10, S.169, Sharma et al. Electrophoresis. 2003, V. 24, S. 2733, Morgan et al. Curr Opin Drug Discov Devel. 2002 Nov;5(6):966-73, Benters et al.
- 10 Nucleic Acids Res. 2002 Jan 15;30(2):E10, Nilsen et al. J Theor Biol. 1997 Jul 21;187(2):273-84. Viele Dendrimere sind kommerziell erwerblich (Genisphere, www.genisphere.com, Chimera Biotech GmbH).

Weitere Kombinationen für die Kern-Komponente aus den oben dargestellten Bestandteilen sind einem Fachmann naheliegend.

#### **1.3.3.3.3.2 Kopplung der Marker-Einheiten an die Kern-Komponente**

Strukturelle Marker-Einheiten können an die Kern-Komponente oder an die Linker-

- 20 Komponente durch eine kovalente Bindung, beispielsweise über einen Cross-linker (Chemistry of protein conjugation and cross-linking, S. Wang, 1993, ISBN 0-8493-5886-8, "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2), oder über eine affine Kopplung erfolgen, beispielsweise Biotin-Streptavidin-Verbindung oder Hybridisierung von Nukleinsäuresträngen oder Antigen-Antikörper-Wechselwirkung ("Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2).

Die Kopplung von Marker-Einheiten an die Kern-Komponente erfolgt in einer Ausführungsform bereits während der Synthese der Nuk-Makromoleküle.

- 30 In einer anderen Ausführungsform erfolgt zunächst die chemische Synthese von Nuk-Makromoleküle, bei denen die Markerkomponente nur aus der Kern-Komponente besteht. Die Kopplung von Marker-Einheiten an die Kern-Komponente erfolgt erst nach dem Einbau von Nuk-Makromoleküle in die Nukleinsäurekette. Durch eine große Zahl 35 der potenziellen Bindungsstellen am Kernteil ist die Wahrscheinlichkeit der Bindung der Marker-Einheiten an die Kern-Komponente und somit an die eingebaute Nuk-Komponente wesentlich größer im Vergleich zu konventionellen Nukleotid-Strukturen.

Die Kopplungschemie im einzelnen hängt von der Struktur der Marker-Einheiten und der Struktur der Kern-Komponente ab.

**Kovalente Kopplung:** Die Verbindung zwischen den Marker-Einheiten und der Kern-

- 5 Komponente kann in einer Ausführungsform widerstandsfähig sein (Beispiel 33), z.B. bei Temperaturen bis zu 100°C, für pH-Bereiche zwischen 3 und 12, und/oder resistent gegen hydrolytische Enzyme (z.B. Esterasen) sein. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und dem Linker unter milden Bedingungen spaltbar.

10

Beispiele für die Kopplung von Nukleinsäuren an Dendrimere (entspricht einer Kopplung von Marker-Einheiten an eine Kernkomponente) sind z.B. in Shchepinov et al. Nucleic Acids Res. 1999 Aug 1;27(15):3035-41, Goh et al. Chem Commun (Camb). 2002 Dec 21;(24):2954 dargestellt.

15

#### **1.3.3.3.3 Kopplung zwischen Linker und Marker**

In einer Ausführungsform ist die Nuk-Linker-Komponente direkt an die signalgebende oder signalvermittelnde Marker-Einheit der Marker- Komponente gebunden, Fig. 4a .

- 20 In einer weiteren Ausführungsform sind ein oder mehrere Nuk-Linker-Komponenten an die Kern- Komponente des Markers gebunden, Fig. 5d.

Die Verbindung zwischen dem Linker und der Kern- Komponente oder dem Linker und der Marker- Komponente hängt von der jeweiligen Struktur der Marker-Einheiten bzw. der Struktur der Kern-Komponente. Die Bindung kann sowohl kovalent als auch affine erfolgen "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2.

**Kovalente Kopplung:** Die Verbindung zwischen der Marker-Einheiten und der Kern-

- 30 Komponente kann in einer Ausführungsform widerstandsfähig sein, z.B. bei Temperaturen bis zu 130°C, für pH-Bereiche zwischen 1 und 14, und/oder resistent gegen hydrolytische Enzyme (z.B. Proteaser, Esterasen)sein . In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und dem Linker unter milden Bedingungen spaltbar.

35

#### **1.3.3.4 Das Verhältnis der Nuk- Komponenten in einem Nuk-Makromolekül**

In einem Nuk-Makromolekül können 1-1000 Nuk-Komponenten vorkommen, s.o. Dabei kann die Verteilung von Nuk-Komponenten in einem Nuk-Makromolekül-

Population schwanken und muß nicht notwendigerweise einen konstanten Wert für jedes einzelne Nuk-Makromolekül darstellen.

- 5 In einer Ausführungsform haben alle Nuk-Makromoleküle eine gleiche Anzahl an Nuk-Komponenten pro ein Nuk-Makromolekül. Beispielsweise können pro ein Strepavidin-Molekül maximal 4 Biotin-Moleküle gebunden werden, bei sättigender Konzentration von Nuk-Linker- Komponenten, eine einheitliche Population an Nuk-Makromolekülen entsteht.
- 10 In einer anderen Ausführungsform haben die Nuk-Makromoleküle einer Population eine definierte durchschnittliche Anzahl von Nuk- Komponenten pro Nuk-Makromolekül, in der Population selbst findet allerdings eine Verteilung der tatsächlichen Besetzung der Nuk-Makromoleküle mit Nuk- Komponenten statt. Die Verteilungsangaben von Nuk- Komponenten pro Nuk-Makromolekül stellen in diesem Fall einen Mittelwert dar. Solche Nuk-Makromoleküle können beispielsweise dann eingesetzt werden, wenn die Nuk- Komponente eine terminierende Eigenschaft aufweist.
- 15

#### **1.3.3.3.5 Das Verhältnis von Marker-Einheiten in einem Nuk-Makromolekül**

- 20 In einem Nuk-Makromolekül können 1-1000 Marker-Einheiten vorkommen, s.o. Dabei kann die Verteilung von Marker-Einheiten in einer Nuk-Makromolekül-Population schwanken und muß nicht notwendigerweise einen konstanten Wert für jedes einzelne Nuk-Makromolekül darstellen.

- 25 In einer Ausführungsform haben alle Nuk-Makromoleküle eine gleiche Anzahl der Marker-Einheiten pro ein Nuk-Makromolekül. Beispielsweise können pro ein Strepavidin-Molekül maximal 4 Biotin-Moleküle gebunden werden, Avidin-Biotin-Technology, Methods in Enzymology v.184, 1990..

- 30 In einer anderen Ausführungsform haben die Nuk-Makromoleküle einer Population eine definierte durchschnittliche Zahl der Marker-Einheiten pro Nuk-Makromolekül, in der Population selbst findet allerdings eine Verteilung der tatsächlichen Besetzung der Nuk-Makromoleküle mit Marker-Einheiten statt. Bei sättigenden Konzentrationen bei der Synthese von Marker-Komponenten findet eine zunehmend einheitlichere Besetzung der Nuk-Makromoleküle mit Marker-Einheiten statt.
- 35 Solche Nuk-Makromoleküle sind beispielsweise für Verfahren von Bedeutung, bei denen Schwankungen in der Signalintensität innerhalb einer Nuk-Makromolekül-Population zu vernachlässigen sind.

So spielt beispielsweise in Bereichen, wo es um den qualitativen Nachweis geht, die exakte Zahl der Marker-Einheiten pro Nuk-Makromolekül eine untergeordnete Rolle. In solchen Fällen ist das Vorhandensein eines stabilen Signals an sich von Bedeutung. Beispiele für solche Verfahren stellen Sequenzierverfahren mit einzelnen Molekülen

5 dar.

Es sollte einem Fachmann naheliegend erscheinen, daß die angeführten Marker-Komponenten eine beträchtlich größere Molekül-Größe und -Masse haben, als die jeweilige Nuk-Komponente selbst. Weiterhin sollten andere Beispiele für

10 makromolekulare Marker-Komponenten einem Fachmann naheliegend erscheinen.

### **1.3.3.3.6 Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle**

Die Nuk-Komponente kann als Substrat für unterschiedliche Enzyme dienen. Beispielsweise dient die Nuk-Komponente, in dieser Ausführungsform als Nukleosid-Triphosphat, als Substrat für eine Polymerase, so daß die Nuk-Komponente in einen wachsenden Strang durch eine Polymerase eingebaut werden kann und somit das gesamte Nuk-Makromolekül an den Strang kovalent gekoppelt wird.

15 Weitere Beispiele für Enzyme stellen Kinasen, Phosphorylasen, Transferasen dar.

20 Die Substrateigenschaften des / der Nuk-Komponente(n) bestimmt/bestimmen die Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle. So kann die Nuk-Komponente als ein Terminator dienen, so daß nur ein einziges Nuk-Makromolekül eingebaut werden kann. In einer anderen Ausführungsform dient die Nuk-Komponente als ein reversibler Terminator, der die Durchführung einer schrittweise kontrollierten Verlängerungsreaktion erlaubt, wie z.B. in Tcherkassov WO 02088382 dargestellt ist.

### **1.3.3.3.7 Funktion der Marker**

Die makromolekulare Marker-Komponente kann in einer Ausführungsform eine signalgebende, signalvermittelnde, katalytische oder affine Funktion haben.

30 Bei der signalgebenden Funktion enthält die Marker-Komponente Bestandteile, die bereits während der chemischen Synthese an Nuk-Makromoleküle gebunden werden, s. Beispiel 33.

35 Bei der signalvermittelnden Funktion trägt die Marker-Komponente Bestandteile, die erst durch eine Reaktion mit signalgebenden Molekülen Ihre Signaleigenschaften entfalten, s. Beispiel 32.

Beispielsweise können mehrere Biotin-Moleküle, z.B. 100, den Marker-Teil bilden.

Nach dem Einbau der Nuk-Makromoleküle erfolgt eine Nachweisreaktion mit modifizierten Streptavidin-Molekülen. In einem anderen Beispiel haben die Nukleinsäureketten die signalvermittelnde Funktion. Nach dem Einbau von Nuk-

- 5 Makromoleküle, erfolgt eine Hybridisierung von einheitlichen Oligonukleotiden mit detektierbaren Einheiten, z.B. Fluoreszenzfarbstoffen (MWG-Biotech) an die Marker-Komponente. In einem weiteren Beispiel haben Amino- oder Merkaptogruppen, beispielsweise 50 Aminogruppen pro Marker, die signalvermittelnde Funktion. Nach dem Einbau der Nuk-Makromoleküle in die Nukleinsäurekette erfolgt eine chemische
- 10 Modifikation mit reaktiven Komponenten, z.B. mit Farbstoffen, wie beispielsweise für eingebaute Allyl-Amino-dUTP beschrieben, Diehl et al. Nucleic Acid Research, 2002, V. 30, Nr. 16 e79.

In einer anderen Ausführungsform hat die makromolekulare Marker-Komponente eine katalytische Funktion (in Form eines Enzyms oder Ribozyms). Dabei können unterschiedliche Enzyme verwendet werden, z.B. Peroxidase oder alkalische Phosphatase. Dank der Kopplung an die Nuk-Komponente kann das jeweilige Enzym durch den Einbau von Nuk-Makromolekülen an den Nukleinsäurestrang kovalent gebunden werden.

- 20 In einer weiteren Ausführungsform hat die makromolekulare Marker-Komponente eine Affinitätsfunktionalität zu einem anderen Molekül. Beispiele für solche Marker bilden Streptavidin-Moleküle oder Nukleinsäureketten; Beispiel 30 oder 32.

**1.3.4. Niedermolekularer Marker** - zum Stand der Technik gehörende Markierung von Nukleotiden beispielsweise mit ein oder zwei Biotin-Molekülen, ein oder zwei Farbstoff-Molekülen, ein oder zwei Hapten-Molekülen (z.B. Digoxigenin).

**1.3.5. Konventionell modifiziertes Nukleotid** - ein Nukleotid mit einem Linker

- 30 (durchschnittliche Länge zwischen 5 und 30 Atomen) und einem Marker. Üblicherweise trägt ein konventionell modifiziertes Nukleotid einen niedermolekularen Marker, z.B. ein Farbstoff- oder ein Biotinmolekül.

Zu Demonstration der Tatsache, daß eine einfache Kombination aus einem konventionell modifizierten Nukleotid mit einem makromolekularen Marker zur

- 35 Aufhebung der Subrateigenschaften der Nukleotide führt, werden in dieser Anmeldung Nukleotide dargestellt, die zwar einen makromolekularen Marker aber einen kurzen Linker mit einer durchschnittlichen Länge von 5 bis 30 Atomen tragen. Auch solche Nukleotide werden als konventionell modifizierte Nukleotide

bezeichnet. Alleine die Kombination zwischen einem konventionell modifizierten Nukleotid und einem makromolekularen Marker reicht erfindungsgemäß nicht aus, um Anforderungen der Definition der Nuk-Makromoleküle zu erfüllen.

- 5 Im Gegensatz dazu, sind Nuk-Makromoleküle eindeutig durch eine Kombination aus einer oder mehreren Nuk-Komponenten, entsprechend einem oder mehreren langen Linkern und einem Marker definiert.

### **1.3.6. Polymerase**

- 10 Bei der Wahl der Polymerase spielt die Art der verwendeten immobilisierten Nukleinsäure (RNA oder DNA) eine entscheidende Rolle:

Falls RNA als Substrat (z.B. mRNA) in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt wird, können handelsübliche RNA-abhängige DNA-Polymerasen eingesetzt werden, z.B. AMV-Reverse Transcriptase (Sigma), M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma), HIV-Reverse Transcriptase ohne RNase-Aktivität. Für bestimmte Anwendungen, können Reverse Transcriptasen von RNase-Aktivität weitgehend frei sein ("Molecular cloning" 1989, Ed. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory), z.B. bei mRNA-Makrierung für Hybridisierungsexperimente.

- 20 Falls DNA als Substrat (z.B. cDNA) verwendet wird, eignen sich als Polymerasen prinzipiell alle DNA-abhängigen DNA-Polymerasen mit oder ohne 3'-5' Exonuklease-Aktivität ("DNA-Replication" 1992 Ed. A.Kornberg, Freeman and company NY), z.B. modifizierte T7-Polymerase vom Typ "Sequenase Version 2" (Amersham Pharmacia Biotech), Klenow Fragment der DNA-Polymerase I mit oder ohne 3'-5' Exonukleaseaktivität (Amersham Pharmacia Biotech), Polymerase Beta verschiedenen Ursprungs ("Animal Cell DNA Polymerases" 1983, Fry M., CRC Press Inc., kommerziell erhältlich bei Chimerix) thermostabile Polymerasen wie beispielsweise Taq-Polymerase (GibcoBRL), proHA-DNA-Polymerase (Eurogentec), Vent, Vent exo -, Pfu usw.

- 30 Auch DNA-abhängige RNA-Polymerasen können verwendet werden, z.B. E.coli RNA-Polymerase, T7-RNA-Polymerase, SP6 RNA Polymerase.

- 35 In der Anmeldung werden DNA-abhängige DNA-Polymerasen als Beispiele für alle Polymerasen betrachtet.

**1.3.7. Spaltbare Verbindung** - Eine unter milden Bedingungen spaltbare Verbindung. Diese Verbindung kann einen Abschnitt im Linker darstellen und kann an

einer oder an mehreren Stellen spaltbar sein. Es kann sich um eine chemisch spaltbare Verbindung, wie z.B. eine Disulfid-, eine Ester-, eine Acetal-, eine Thioesterverbindung (Short WO 9949082, Tcherkassov WO 02088382) handeln. Es kann auch eine photochemisch spaltbare Verbindung, wie in (Rothschild WO 9531429)

5 dargestellt sein. Es kann auch eine enzymatisch spaltbare Verbindung (beispielsweise eine Peptid- oder Polypeptide-Bindung, Odedra WO 0192284), spaltbar durch Peptidasen, eine Poly- oder Oligosaccharid-Bindung, spaltbar durch Disaccharidasen) sein, wobei die Spaltung durch ein spezifisches Enzym zwischen bestimmten Monomeren der spaltbaren Stellen stattfinden kann.

10 Mehrere Beispiele für spaltbare Verbindungen sind bekannt. Die Kopplung einer solchen Verbindung ist beispielsweise beschrieben in (Tcherkassov 02088382, Metzker et al. Nucleic Acid Research 1994, V.22, S. 4259, Canard et al. Gene, 1994, V. 148, 1, , Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642.). Eine Spaltbare Verbindung kann ein Teil des Linkers sein oder die Kopplungsstelle des

15 Linkers an das Nukleotid bilden, oder die Verbindung zwischen der Linker-Komponente und der Makrer-Komponente, oder die Verbindung zwischen den Marker-Einheiten und der Kern-Komponente.

**1.3.8 DNA - Deoxyribonukleinsäure verschiedenen Ursprungs und unterschiedlicher Länge (z.B. Oligonukleotide, Polynukleotide, Plasmide, genomische DNA, cDNA, ssDNA, dsDNA)**

#### **1.3.9 RNA - Ribonukleinsäure**

**1.3.10 dNTP - 2'-deoxi-Nucleosid-Triphosphate, Substrate für DNA-Polymerasen und Reverse-Transkriptasen**

**1.3.11 NTP - Ribonukleosid-Triphosphate, Substrate für RNA-Polymerasen**

30 **1.3.12 Abkürzung "NT" wird auch bei der Längenangabe einer Nukleinsäuresequenz verwendet, z.B. 1.000 NT. In diesem Fall steht "NT" für Nukleosid-Monophosphate.**

Im Text wird bei Abkürzungen die Mehrzahl durch Verwendung des Suffixes "s" gebildet, "NT" steht zum Beispiel für "Nukleotid", "NTs" steht für mehrere Nukleotide.

35

**1.3.13 NSK - Nukleinsäurekette. DNA oder RNA.**

1.3.14 Gesamtsequenz - Summe aller Sequenzen im Ansatz, sie kann ursprünglich aus einer oder mehreren NSKs bestehen. Dabei kann die Gesamtsequenz Teile oder Äquivalente einer anderen Sequenz oder von Sequenz-Populationen darstellen (z.B. mRNA, cDNA, Plasmid-DNA mit Insert, BAC, YAC) und aus einer oder 5 unterschiedlichen Spezies stammen.

1.3.15 NSK - Nukleinsäurekettenfragment (DNA oder RNA), das einem Teil der Gesamtsequenz entspricht, NSKFs - Nukleinsäurekettenfragmente. Die Summe der NSKFs bildet ein Äquivalent zur Gesamtsequenz. Die NSKFs können beispielsweise 10 Fragmente von DNA- oder RNA-Gesamtsequenz sein, die nach einem Fragmentierungsschritt entstehen.

1.3.16 Primerbindungstelle (PBS) - Teil der Sequenz in der NSK oder NSKF, an den der Primer bindet.

15

1.3.17 Referenzsequenz - eine bereits bekannte Sequenz, zu der die Abweichungen in der zu untersuchenden Sequenz bzw. in den zu untersuchenden Sequenzen (z.B. Gesamtsequenz) ermittelt werden. Als Referenzsequenzen können in Datenbanken zugängliche Sequenzen verwendet werden, wie z.B. aus der NCBI-Datenbank.

20

1.3.18 Tm - Schmelztemperatur

1.3.19 Sterisches Hindernis: Sterisch anspruchsvolle Gruppe, die durch ihre chemische Struktur die Eigenschaften der mit dieser Gruppe gekoppelten Nukleotide so verändert, dass diese durch eine Polymerase in einer Extensionsreaktion nicht nacheinander eingebaut werden können.

1.3.20 PNA - Peptide Nucleic Acid

## 2. Detaillierte Beschreibung:

Die Erfindung beschreibt eine neue Klasse an modifizierten Nukleotiden. 1. Aspekt der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen mit der Struktur:

(Nuk-Linker)<sub>n</sub>-Marker

5

wobei:

- Nuk - ein Nukleotid oder ein Nukleosid ist (Nuk-Komponente)
- Linker - eine Linker-Komponente, die folgende Bestandteile einschließt:
  - a) Kopplungseinheit L - ein Teil des Linkers, das die Verbindung zwischen Nuk und dem Linkerrest darstellt
  - b) Polymer - ein Teil des Linkers, das ein wasserlösliches Polymer mit einer durchschnittlichen Länge zwischen 100 und 10.000 Atome ist
  - c) Kopplungseinheit T - ein Teil des Linkers, das die Verbindung zwischen dem Linkerrest und dem Marker darstellt
- Marker - eine Marker-Komponente ist
- n - eine ganze Zahl zwischen 1 und 100 ist

Ein weiterer Aspekt 2 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt (Fig. 3A):

20

Wobei:

Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren Modifikationen, wobei L die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente darstellt (Kopplungseinheit L) und X die Kopplungsstelle der Kopplungseinheit L an der Base ist

R<sub>1</sub> - ist H

R<sub>2</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Halogen, NH<sub>2</sub>, SH oder geschützte OH-Gruppe

R<sub>3</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, PO<sub>3</sub>, SH, NH<sub>2</sub>, O- R<sub>3-1</sub>, P(O)<sub>m</sub>- R<sub>3-1</sub>, NH-R<sub>3-1</sub>, S-R<sub>3-1</sub>, Si-R<sub>3-1</sub> wobei R<sub>3-1</sub> eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist und m 1 oder 2 ist.

R<sub>4</sub> - ist H oder OH

R<sub>5</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, oder Monophosphat-Gruppe, oder Diphosphat-Gruppe oder Triphosphat-Gruppe oder Polyphosphate

Ein weiterer Aspekt 3 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt (Fig. 3B):

Wobei:

5 Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähigen Modifikationen

R<sub>1</sub> - ist H

10 R<sub>2</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, NH<sub>2</sub>, SH oder geschützte OH-Gruppe

15 R<sub>3</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe O- R<sub>3-2</sub>, P(O)<sub>m</sub>- R<sub>3-2</sub>, wobei m 1 oder 2 ist, NH-R<sub>3-2</sub>, S-R<sub>3-2</sub>, SI-R<sub>3-2</sub> oder, wobei R<sub>3-2</sub> die Kopplungsstelle der Kopplungseinheit L an das Nukleotid ist

Kopplungseinheit L - die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente

20 R<sub>4</sub> - ist H oder OH

R<sub>5</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, oder Monophosphat-Gruppe, oder Diphosphat-Gruppe oder Triphosphat-Gruppe

Ein weiterer Aspekt 4 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt (Fig. 3B):

Wobei:

30 Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähigen Modifikationen

R<sub>1</sub> - ist H

35 R<sub>2</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, NH<sub>2</sub>, SH oder geschützte OH-Gruppe

R<sub>3</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, PO<sub>3</sub>, SH, NH<sub>2</sub>, O- R<sub>3-1</sub>,

P(O)m- R<sub>3-1</sub>, NH-R<sub>3-1</sub>, S-R<sub>3-1</sub>, Si-R<sub>3-1</sub> wobei R<sub>3-1</sub> eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist und m 1 oder 2 ist.

R<sub>4</sub> - ist H oder OH

5

R<sub>5</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe O- R<sub>5-1</sub>-L, oder P-(O)<sub>3</sub>- R<sub>5-1</sub>-L (modifizierte Monophosphat-Gruppe), oder P-(O)<sub>3</sub>-P-(O)<sub>3</sub>-R<sub>5-1</sub>-L (modifizierte Diphosphat-Gruppe)

10 oder P-(O)<sub>3</sub>-P-(O)<sub>3</sub>-P-(O)<sub>3</sub>- R<sub>5-1</sub>-L (modifizierte Triphosphat-Gruppe), wobei R<sub>5-1</sub> die Kopplungsstelle der Kopplungseinheit L an das Nukleotid ist und Kopplungseinheit L die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente ist.

15 Ein weiterer Aspekt 5 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 4, wobei Kopplungseinheit L folgende strukturelle Elemente einschließt:

R<sub>6</sub>-NH-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-O-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-S-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-SS-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-CO-NH-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-NH-CO-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-CO-O-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-O-CO-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-CO-S-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-S-CO-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-P(O)<sub>2</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-Si-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-B-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH=CH-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(A-CH=CH-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH=CH-B-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-A-CH=CH-(CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(-CH=CH-CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>-B-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(C≡C-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(A-C≡C-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(C≡C-B-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-A-C≡C-(CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(-C≡C-CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>-B-R<sub>7</sub>,

wobei R<sub>6</sub> - die Nuk-Komponente ist, R<sub>7</sub> - der Linkerrest ist und A und B unabhängig folgende strukturelle Elemente einschließen: -NH-, -O-, -S-, -SS-, -CO-NH-, -NH-CO-, -CO-O-, -O-CO-, -CO-S-, -S-CO-, -P(O)<sub>2</sub>-, -Si-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, eine photolabile Gruppe, wobei n - gleich 1 bis 5 ist

30

Ein weiterer Aspekt 6 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 5, wobei die Linker-Komponente ein wasserlösliches Polymer einschließt.

35

Ein weiterer Aspekt 7 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 6, wobei die Linker-Komponente wasserlösliche Polymere unabhängig ausgewählt aus folgender Gruppe einschließt:

Polyethylen-glycol (PEG), Polysaccharide, Dextran, Polyamide, Polypeptide, Polyphosphate, Polyacetate, Poly(alkyleneglycole), Kopolymere aus Ethylenglycol und Propylenglycol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone), Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(x-Hydroxy-Säuren), Poly-Acrylicsäure, Poly-Acrylamid, Poly(Vinylalkohol).

5

Ein weiterer Aspekt 8 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 7, wobei die Linker-Komponente eine durchschnittliche Länge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 10000, 10000 bis 100000 Atomen hat.

10

Ein weiterer Aspekt 9 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 8, wobei eine Marker-Komponente eine signalgebende, signalvermittelnde, katalytische oder affine Funktion hat

15

Ein weiterer Aspekt 10 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 9, wobei eine Marker-Komponente aus einer strukturellen Marker-Einheit besteht

20

Ein weiterer Aspekt 11 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 9, wobei eine Marker-Komponente aus mehreren strukturellen Marker-Einheiten gebunden an eine Kern-Komponente besteht

Ein weiterer Aspekt 12 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 10 oder 11, wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden strukturellen Elemente einschließt:

Biotin, Hapten, radioaktives Isotop, selenes Erdenelement, Farbstoff, Fluoreszenzfarbstoff.

30

Ein weiterer Aspekt 13 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 10 oder 11 , wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt:

Nanokristalle oder deren Modifikationen, Proteine oder deren Modifikationen, Nukleinsäureketten oder deren Modifikationen, Teilchen oder deren Modifikationen.

35

Ein weiterer Aspekt 14 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 13, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eines der folgenden Proteine einschließt:

- 5 Enzyme oder deren Konjugate oder Modifikationen,  
Antikörper oder deren Konjugate oder Modifikationen,  
Streptavidin oder seine Konjugate oder Modifikationen,  
Avidin oder seine Konjugate oder Modifikationen

10 Ein weiterer Aspekt 15 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 13, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eine der folgenden Arten Nukleinsäureketten einschließt: DNA, RNA, PNA, wobei die Länge von Nukleinsäureketten zwischen 10 und 10.000 Nukleotiden oder deren Äquivalente liegt.

15 Ein weiterer Aspekt 16 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 11 bis 15, wobei die Kern-Komponente der Marker-Komponente unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt: wasserlöslichen Polymer unabhängig ausgewählt aus der Gruppe von: Polyamide (z.B. Polypeptide), Poly-Acrysäure und deren Derivate, Poly-Acrylamide und deren Derivate, Poly-Vinylalkohole und deren Derivate, Nukleinsäureketten und deren Derivate, Streptavidin oder Avidin und deren Derivate, Dendrimere, wobei einzelne Polymere linear oder verzweigt oder unter einander vernetzt sein können

20 Ein weiterer Aspekt 17 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 9, 11 bis 16, wobei die Verbindung zwischen mehreren strukturellen Marker-Einheiten und der Kern-Komponente kovalent oder affine erfolgt.

30 Ein weiterer Aspekt 18 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 10, wobei die Verbindung zwischen einer strukturellen Marker-Einheit und dem Linker kovalent oder affine erfolgt.

35 Ein weiterer Aspekt 19 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 9, 11 bis 17, wobei die Verbindung zwischen der Kern-Komponente und dem Linker kovalent oder affine erfolgt

Ein weiterer Aspekt 20 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 19, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt.

5

Ein weiterer Aspekt 21 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 20, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und die Linker-Komponente eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

10

15

20

Ein weiterer Aspekt 22 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 21, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, daß nur eine Nuk-Komponente in einen wachsenden Strang eingebaut werden kann.

25

Ein weiterer Aspekt 23 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 19, wobei mehrere Nuk-Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt sind, wobei die Länge der jeweiligen Linker- Komponente zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt.

30

Ein weiterer Aspekt 24 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 19, 23, wobei mehrere Nuk- Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt, wobei die Länge der jeweiligen Linker- Komponente zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und der jeweilige Linker eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

35

Ein weiterer Aspekt 25 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 19, 23, 24, wobei mehrere Nuk- Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker- Komponenten gekoppelt, wobei die Länge der jeweiligen Linker- Komponente zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, daß nur eine Nuk-Komponente in eine wachsende Nukleinsäurekette eingebaut werden kann.

5

Ein weiterer Aspekt 26 der Erfindung betrifft Oligonucleotide oder Polynucleotide die mindestens ein Nuk-Makromolekül nach Aspekten 1 bis 25 pro eine Nukleinsäurekette einschließen.

10

Ein weiterer Aspekt 27 der Erfindung betrifft Oligonucleotide oder Polynucleotide nach Aspekt 26, wobei Oligo- oder Polynucleotide RNA, DNA oder PNA sind, deren Länge zwischen 5 und 50.000 Nukleotide beträgt.

15

Ein weiterer Aspekt 28 der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Modifizierung von Nukleinsäureketten, wobei für die Kopplung Nuk-Makromoleküle nach Aspekten 1 bis 25 verwendet werden

20

Ein weiterer Aspekt 29 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 28, wobei die Modifizierung durch eine enzymatische Kopplung erfolgt und das Reaktionsgemisch folgende Komponenten einschließt:

25

- mindestens eine Art der Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenstufen nach Aspekten 1 bis 25, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt
- mindestens eine Population der Nukleinsäureketten,
- mindestens eine Enzymart zur Kopplung von Nuk-Makromoleküle an die Nukleinsäureketten,

30

Ein weiterer Aspekt 30 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 28, wobei die Modifizierung durch eine enzymatische Kopplung erfolgt und das Reaktionsgemisch folgende Komponenten einschließt:

35

- mindestens eine Art der Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenstufen nach Aspekten 1-25, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt
- mindestens eine Population der Nukleinsäureketten,

- mindestens eine Enzymart zur Kopplung von Nuk-Makromoleküle an die Nukleinsäureketten
- mindestens eine weitere Art von Nukleosidtriphosphaten

5 Ein weiterer Aspekt 31 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 29, 30, wobei die Enzymart unabhängig eine der folgenden Gruppen einschließt: DNA-Polymerase, RNA-Polymerase, Terminale Transferase,

10 Ein weiterer Aspekt 32 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 30, wobei die "weitere Art" der Nukleosidtriphosphaten unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe von: Ribo-Nukleosidtriphosphaten (ATP, GTP, UTP, CTP), von 2'-Deoxyribonukleosid-Triphosphaten (dATP, dUTP, dTTP, dCTP, dGTP), von 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddATP, ddGTP, ddUTP, ddCTP, ddTTP).

15 Ein weiterer Aspekt 33 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 32, wobei die "weitere Art" der Nukleosidtriphosphaten konventionell modifizierte Nukleotide mit einer Markierung sind, wobei diese Markierung unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe von: ein Fluoreszenzfarbstoff, ein Biotin, ein Hapten, ein radioaktives Element.

20 Ein weiterer Aspekt 34 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 33, wobei mindestens zwei unterschiedliche Populationen an Nukleinsäureketten präsent sind

25 Ein weiterer Aspekt 35 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 34, wobei mindestens eine der Populationen der Nukleinsäureketten eine Primer-Funktion hat und mindestens eine Population der Nukleinsäureketten eine Matrizen-Funktion.

30 Ein weiterer Aspekt 36 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 28, wobei die Modifizierung durch eine chemische Kopplung erfolgt, wobei die Kopplung der Nuk-Makromoleküle an Nukleinsäureketten durch Phosphoroamidit-Kopplung erfolgt.

- Ein weiterer Aspekt 37 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 36, wobei im Markierungsverfahren Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die die Kopplung nur einer einzigen Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäure-Strang zulassen und der mehrfache Einbau durch Modifikationen an der Nuk-Komponente, und/oder der Linker-Komponente und/oder der Marker-Komponente verhindert wird.
- Ein weiterer Aspekt 38 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 37, wobei die weitere Kopplung reversibel verhindert wird.
- Ein weiterer Aspekt 39 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 37, wobei die weitere Kopplung irreversibel verhindert wird.
- Ein weiterer Aspekt 40 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 36, wobei im Markierungsverfahren Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die eine Kopplung mehrerer Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäurestrang zulassen
- Ein weiterer Aspekt 41 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28-40, wobei die an der Reaktion teilnehmenden Nukleinsäureketten an eine feste Phase gekoppelt sind und adressierbare Positionen haben.
- Ein weiterer Aspekt 42 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 41, wobei die Nukleinsäureketten eine einheitliche Population darstellen
- Ein weiterer Aspekt 43 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 41, wobei die Nukleinsäureketten zwei oder mehrere unterschiedliche Populationen darstellen und jede der Populationen eine adressierbare Position auf der festen Phase hat
- Ein weiterer Aspekt 44 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41,42, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen an einer Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach der Kopplung am verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird.

Ein weiterer Aspekt 45 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41,42, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen an einer Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Kopplung oder nach der Kopplung von der in den wachsenden Nukleinsäurestrang eingebauten Nuk-Komponente abgetrennt wird.

5

Ein weiterer Aspekt 46 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41,43, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen in einem Reaktionsansatz parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei diese Populationen jeweils unterschiedliche adressierbare Positionen an der festen Phase haben und die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach der Kopplung am verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird.

10

15

Ein weiterer Aspekt 47 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41,43, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen in einem Reaktionsansatz parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei diese Populationen unterschiedliche adressierbare Positionen an der festen Phase haben und die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Kopplung oder nach der Kopplung von der Nuk-Komponente abgetrennt wird.

20

Ein weiterer Aspekt 48 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen auf der festen Phase als Spots auf einer planen Oberfläche verteilt sind, wobei pro ein Spot Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

30

Ein weiterer Aspekt 49 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen an den Kugelchen bzw. Partikel befestigt sind, wobei pro ein Kugelchen Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

35

Ein weiterer Aspekt 50 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen in einem Multigefäßsystem, wie Mikrotiterplatte oder Nanotiterplatte oder Pikotiterplatte, verteilt sind, wobei in einem Gefäß des Multigefäßsystems die Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

Ein weiterer Aspekt 51 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 35 und 37 bis 50, das folgende Schritte einschließt:

- 10            a) Bereitstellung mindestens einer Population an einzelsträngigen Nukleinsäureketten
  - b) Hybridisierung von sequenzspezifischen Primern an diese Nukleinsäureketten, wobei extensionsfähige NSK-Primer-Komplexe entstehen
  - 15            c) Inkubation von mindestens einer Art der Nuk-Makromoleküle nach Aspekten 1 bis 25 zusammen mit einer Art der Polymerase nach Aspekt 31 mit den in Schritten a und b bereitgestellten NSK-Primer-Komplexen unter Bedingungen, die den Einbau von komplementären Nuk-Makromolekülen zulassen, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt.
  - 20            d) Entfernung der nicht eingebauten Nuk-Makromoleküle von den NSK-Primer-Komplexen
  - e) Detektion der Signale von in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
  - f) Entfernung der Linker-Komponente und der Marker-Komponente von den in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
  - g) Waschen der NSK-Primer-Komplexe
- gegebenenfalls Wiederholung der Schritte (c) bis (g),

30            Ein weiterer Aspekt 52 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28-40, wobei die Nukleinsäureketten an eine feste Phase in zufälliger Anordnung gekoppelt sind.

35            Ein weiterer Aspekt 53 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 41, 52 zur parallelen Sequenzanalyse von Nukleinsäuresequenzen (Nukleinsäureketten, NSKs), bei dem man

Fragmente (NSKFs) einzelsträngiger NSKs mit einer Länge von etwa 50 bis 1000 Nukleotiden erzeugt, die überlappende Teilsequenzen einer Gesamtsequenz darstellen können, man

- 5            die NSKFs unter Verwendung eines einheitlichen oder mehrerer unterschiedlichen Primer in Form von NSKF-Primer-Komplexen auf einer Reaktionsoberfläche in einer zufälligen Anordnung bindet, wobei die Dichte der an die Oberfläche gebundenen NSKF-Primer-Komplexen eine optische Detektion der Signale von einzelnen eingebauten Nuk-Makromolekülen zuläßt, man
- 10            eine zyklische Aufbaureaktion des komplementären Stranges der NSKFs unter Verwendung einer oder mehrerer Polymerasen durchführt, indem man
- 15            a)        zu den auf der Oberfläche gebundenen NSKF-Primer-Komplexen eine Lösung zugibt, die eine oder mehrere Polymerasen und ein bis vier Nuk-Makromoleküle enthält, die eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Marker-Komponente haben, wobei die bei gleichzeitiger Verwendung von mindestens zwei Nuk-Makromoleküle jeweils an die Marker-Komponente befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe so gewählt sind, dass sich die verwendeten Nuk-Makromoleküle durch Messung unterschiedlicher Fluoreszenzsignale voneinander unterscheiden lassen, wobei die Nuk-Makromoleküle strukturell so modifiziert sind, dass die Polymerase nach Einbau eines solchen Nuk-Makromoleküls in einen wachsenden komplementären Strang nicht in der Lage ist, ein weiteres Nuk-Makromolekül in denselben Strang einzubauen, wobei die Linker-Komponente mit der Marker-Komponente abspaltbar sind, man
- 20            b)        die in Stufe a) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen inkubiert, die zur Verlängerung der komplementären Stränge geeignet sind, wobei die komplementären Stränge jeweils um ein Nuk-Makromolekül verlängert werden, man
- 25            c)        die in Stufe b) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung nicht in einen komplementären Strang eingebauter Nuk-Makromoleküle geeignet sind, man
- 30
- 35

5 d) die einzelnen, in komplementäre Stränge eingebauten Nuk-Makromoleküle durch Messen des für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Signals detektiert, wobei man gleichzeitig die relative Position der einzelnen Fluoreszenzsignale auf der Reaktionsoberfläche bestimmt, man

10 e) zur Erzeugung unmarkierter (NTs oder) NSKFs die Linker-Komponente und die Marker-Komponente von den am komplementären Strang angefügten Nuk-Komponenten abspaltet, man

15 f) die in Stufe e) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung der Marker-Komponente geeignet sind, man

15 die Stufen a) bis f) gegebenenfalls mehrfach wiederholt,

20 wobei man die relative Position einzelner NSKF-Primer-Komplexe auf der Reaktionsoberfläche und die Sequenz dieser NSKFs durch spezifische Zuordnung der in Stufe d) in aufeinanderfolgenden Zyklen an den jeweiligen Positionen detektierten Fluoreszenzsignale zu den Nuk-Makromolekülen bestimmt.

25 Ein weiterer Aspekt 54 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus nur jeweils eine Art der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

30 Ein weiterer Aspekt 55 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus jeweils zwei unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

35 Ein weiterer Aspekt 56 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus jeweils vier unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

Ein weiterer Aspekt 57 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 53, dadurch gekennzeichnet, dass die NSKs Varianten einer bekannten Referenzsequenz sind und man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in den Zyklen abwechselnd jeweils zwei unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle und zwei unmarkierte NTs einsetzt und man die Gesamtsequenzen durch Vergleich mit der Referenzsequenz ermittelt.

5

Ein weiterer Aspekt 58 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach den Aspekten 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man in die NSKFs jeweils eine Primerbindungsstelle (PBS) einführt, wobei man bei doppelsträngigen NSKs an beiden komplementären Einzelsträngen jeweils eine PBS einführt und wobei die Primerbindungsstellen für alle NSKFs jeweils gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen.

10

15

20

Ein weiterer Aspekt 59 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach den Aspekten 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man die NSKFs mit Primern in einer Lösung unter Bedingungen in Kontakt bringt, die zur Hybridisierung der Primer an die Primerbindungsstellen (PBSs) der NSKFs geeignet sind, wobei die Primer untereinander gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen, und man die gebildeten NSKF-Primer-Komplexe anschließend auf der Reaktionsoberfläche bindet.

25

30

Ein weiterer Aspekt 60 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach den Aspekten 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man die NSKFs zunächst auf der Reaktionsoberfläche immobilisiert und erst anschließend mit Primern unter Bedingungen in Kontakt bringt, die zur Hybridisierung der Primer an die Primerbindungsstellen (PBSs) der NSKFs geeignet sind, wobei NSKF-Primer-Komplexe gebildet werden, wobei die Primer untereinander gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen.

35

Ein weiterer Aspekt 61 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 53 bis 60, bei dem an 10 bis 100.000 unterschiedlichen Sequenzenpopulationen die Einbaureaktion parallel durchgeführt

Ein weiterer Aspekt 62 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 53 bis 60, bei dem an 100.000 bis 100.000.000 unterschiedlichen Sequenzenpopulationen die Einbaureaktion parallel durchgeführt.

Ein weiterer Aspekt 63 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 62, wobei die Sequenzen der Nukleinsäureketten ermittelt werden

5 Ein weiterer Aspekt 64 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 63, wobei die Marker-Komponente fluoreszent markiert ist

10 Ein weiterer Aspekt 65 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41 bis 64, wobei die feste Phase unabhängig aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Silicon, Glas, Keramik, Kunststoffe, Gele oder deren Modifikationen

15 Im weiteren Aspekt 66 der Erfindung sind besonders bevorzugt makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt, Fig. 3A:

15 Wobei:

20 Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren Modifikationen , wobei L die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente darstellt (Kopplungseinheit L) und X die Kopplungsstelle der Kopplungseinheit L an der Base ist, wobei die Kopplungsstelle an Pyrimidinbasen an der 5-Position oder 4-Position am Pyrimidinring ist und an der 7-Position der Deazapurine.

25 R<sub>2</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, oder geschützte OH-Gruppe

R<sub>3</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, NH<sub>2</sub>,

R<sub>4</sub> - ist H oder OH

30 R<sub>5</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, oder Monophosphat-Gruppe, oder Diphosphat-Gruppe oder Triphosphat-Gruppe

35 Ein weiterer Aspekt 67 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 66, wobei die Kopplungseinheit L folgende strukturelle Elemente einschließt:

R<sub>6</sub>-NH-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-O-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-S-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-SS-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-CO-NH-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-NH-CO-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-CO-O-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-O-CO-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-CO-S-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-S-CO-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-P(O)<sub>2</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-Si-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-B-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH=CH-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(A-CH=CH-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH=CH-B-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-A-CH=CH-(CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(-CH=CH-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-B-R<sub>7</sub>,

$R_6-(C\equiv C-)_n-R_7$ ,  $R_6-(A-C\equiv C-)_n-R_7$ ,  $R_6-(C\equiv C-B-)_n-R_7$ ,  
 $R_6-A-C\equiv C-(CH_2-)_n-R_7$ ,  $R_6-(-C\equiv C-CH_2)_n-B-R_7$ ,

5 wobei  $R_6$  - die Nuk-Komponente ist,  $R_7$  - der Linkerrest ist und A und B folgende strukturelle Elemente einschließen: -NH-, -O-, -S-, -SS-, -CO-NH-, -NH-CO-, -CO-O-, -O-CO-, -CO-S-, -S-CO-, -P(O)<sub>2</sub>-, -Si-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, eine photolabile Gruppe, wobei n - gleich 1 bis 5 ist

10 Ein weiterer Aspekt 68 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 66, wobei die Linker-Komponente ein wasserlösliches Polymer einschließt.

15 Ein weiterer Aspekt 69 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 68, wobei die Linker-Komponente wasserlösliche Polymere unabhängig ausgewählt aus folgender Gruppe einschließt:

20 Polyethylen-glycol (PEG), Polysaccharide, Dextran, Polyamide, Polypeptide, Polyphosphate, Polyacetate, Poly(alkyleneglycole), Kopolymere aus Ethylenglycol und Propylenglycol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone), Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(x-Hydroxy-Säuren), Poly-Acrysäure, Poly-Acrylamid, Poly(Vinylalkohol).

25 Ein weiterer Aspekt 70 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 66 bis 69, wobei eine Linker-Komponente eine durchschnittliche Länge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 10000, 10000 bis 100000 Atome hat.

30 Ein weiterer Aspekt 71 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 66 bis 69, wobei eine Marker-Komponente eine signalgebende, signalvermittelnde, katalytische oder affine Funktion hat

Ein weiterer Aspekt 72 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 66 bis 69, wobei eine Marker-Komponente aus einer strukturellen Marker-Einheit besteht

35 Ein weiterer Aspekt 73 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 66 bis 69, wobei eine Marker-Komponente aus mehreren strukturellen Marker-Einheiten gebunden an eine Kern-Komponente besteht

Ein weiterer Aspekt 74 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 72 oder 73, wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden strukturellen Elemente einschließt:

5 Biotin, Hapten, radioaktives Isotop, seltene Erdenatom, Farbstoff, Fluoreszenzfarbstoff.

Ein weiterer Aspekt 75 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 72 oder 73, wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt:

10 Nanokristalle oder deren Modifikationen, Proteine oder deren Modifikationen, Nukleinsäureketten oder deren Modifikationen, Teilchen oder deren Modifikationen.

15 Ein weiterer Aspekt 76 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 75, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eines der folgenden Proteine einschließt:

20 Enzyme oder deren Konjugate und Modifikationen,  
Antikörper oder deren Konjugate und Modifikationen,  
Streptavidin oder seine Konjugate und Modifikationen,  
Avidin oder seine Konjugate oder Modifikationen

25 Ein weiterer Aspekt 77 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 75, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eine der folgenden Arten Nukleinsäureketten einschließt: DNA, RNA, PNA, wobei die Länge von Nukleinsäureketten zwischen 10 und 10.000 Nukleotide liegt

30 Ein weiterer Aspekt 78 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 73 bis 77, wobei die Kern-komponente der Marker-Komponente unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt: wasserlöslichen Polymer aus der Gruppe von: Polyamide (z.B. Polypeptide), Poly-Acrylsäure und deren Derivate, Poly-Acrylamide und deren Derivate, Poly-Vinylalkohole und deren Derivate, Nukleinsäuren und deren Derivate, Streptavidin oder Avidin und deren Derivate, Dendrimere, wobei diese Elemente linear oder verzweigt oder unter einander vernetzt sein können

Ein weiterer Aspekt 79 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 66 bis 71, 73 bis 78, wobei die Verbindung zwischen mehreren strukturellen Marker-Einheiten und der Kern-Komponente kovalent oder affine erfolgt.

5

Ein weiterer Aspekt 80 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 66 bis 73, wobei die Verbindung zwischen einer strukturellen Marker-Einheit und dem Linker kovalent oder affine erfolgt

10

Ein weiterer Aspekt 81 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 66 bis 71, 73 bis 78, wobei die Verbindung zwischen der Kern-Komponente und dem Linker kovalent oder affine erfolgt

15

Ein weiterer Aspekt 82 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 66 bis 81, wobei nur eine Nuk- Komponente mit einem gekoppelten Linker an die Marker-Komponente gekoppelt ist

20

Ein weiterer Aspekt 83 der Erfindung betrifft eine Makromolekulare Verbindung nach Aspekten 66 bis 82, wobei nur eine Nuk- Komponente mit einem gekoppelten Linker an die Marker-Komponente gekoppelt ist, wobei der Linker eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

25

Ein weiterer Aspekt 84 der Erfindung betrifft eine Makromolekulare Verbindung nach Aspekten 66 bis 82, wobei nur eine Nuk- Komponente mit einem gekoppelten Linker an die Marker-Komponente gekoppelt ist, wobei ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, daß nur eine Nuk-Komponente in einen wachsenden Strang eingebaut werden kann.

30

Ein weiterer Aspekt 85 der Erfindung betrifft eine Makromolekulare Verbindung nach Aspekten 66 bis 71, 73 bis 82, wobei mehrere Nuk- Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt

35

Ein weiterer Aspekt 86 der Erfindung betrifft eine Makromolekulare Verbindung nach Aspekten 66 bis 71, 73 bis 82, wobei mehrere Nuk- Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt, wobei der jeweilige Linker eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

Ein weiterer Aspekt 87 der Erfindung betrifft eine Makromolekulare Verbindung nach Aspekten 66 bis 71, 73 bis 82, wobei mehrere Nuk- Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker- Komponenten gekoppelt, wobei ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, daß nur eine Nuk-Komponente in eine wachsende Nukleinsäurekette eingebaut werden kann.

5 Ein weiterer Aspekt 88 der Erfindung betrifft Oligonucleotide oder Polynucleotide die mindestens ein Nuk-Makromolekül nach Aspekten 66 bis 87 pro eine Nukleinsäurekette einschließen.

10 Ein weiterer Aspekt 89 der Erfindung betrifft Oligonucleotide oder Polynucleotide nach Aspekt 88, wobei Oligo- oder Polynucleotide RNA, DNA oder PNA sind, deren Länge zwischen 5 und 50.000 Nukleotide beträgt.

15 **Gegenüberstellung von Eigenschaften konventionell modifizierter Nukleotide und Nuk-Makromoleküle:**

**Substrateigenschaften der konventionell modifizierten Nukleotide**

Der Einfluß unterschiedlicher Linkergrößen, der chemischen Linkerzusammensetzung 20 und die unterschiedlicher Größe und Beschaffenheit von niedermolekularen Markern auf die Substrat-Eigenschaften der Nukleotide (G. Wright et al. Pharmac.Ther. 1990, V. 47, S. 447, Klevan US Patent 4828979, Lee, et al. Nucleic Acid Research 1992, V. 20, 2471, J. Brandis Nucleic Acid Research, 1999, V.27, 1912 ) macht deutlich, daß bereits geringfügige Veränderungen an der Nukleotid-, Linker- und Marker-Struktur 25 zu einer starken Veränderung der Substrateigenschaften der modifizierten Nukleotide führen können.

Folgerichtig läßt sich nachweisen, daß die Kopplung eines deutlich größeren Moleküls (z.B. eines Proteins) an ein konventionell modifiziertes Nukleotid zur Aufhebung von 30 dessen Substrateigenschaften führt, s. Beispiel 34B.

Aus diesem Grund konnten bis jetzt signalverstärkende Makromoleküle nur nach erfolgtem enzymatischem Einbau der Nukleotide in die Nukleinsäurekette mit dem Nukleotid gekoppelt werden.

35 Trotz der naheliegenden Überlegung, eine mehrfache Markierung in Form einer makromolekularen Marker-Komponente an Nukleotide zu koppeln, gelang es noch nicht, diesen Schritt durch einfache Kombination zwischen konventionellen

Nukleotidstrukturen und einer makromolekularen Marker-Komponente unter Beibehaltung der Substrateigenschaft der Nukleotide zu realisieren.

- 5 Die Masse der konventionell modifizierten Nukleotide liegt im Wesentlichen im selben Bereich wie bei nicht modifizierten Nukleotiden, und ist relativ gering verglichen mit der Masse von Proteinen, wie z.B. Streptavidin oder Polymerasen. Die Steigerung der Masse des Nukleotids durch Einführung makromolekularer Komponenten kann zu Veränderung von biochemischen und physikalischen Eigenschaften von Nukleotiden führen.
- 10 Die Überwindung dieses Nachteils des Standes der Technik gelang überraschenderweise durch die Einführung einer makromolekularen Linker-Komponente zwischen der Nuk- Komponente und der makromolekularen Marker-Komponente.
- 15 Überraschenderweise behalten die erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle ihre Substrataktivität trotz der massiven Veränderungen in ihren Eigenschaften bei und können von Enzymen verwendet werden. So bauen beispielsweise Polymerasen die erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle in den wachsenden Strang ein. Terminale 20 deoxy-Nucleotidyl-Transferase (TdT) können Nuk-Makromoleküle an ein 3'-Ende einer Nukleinsäure koppeln (Beispiel 34B,C und Beispiel 35).
- 25 Einem Fachmann sollte es naheliegend erscheinen, daß die Masse der erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle ein vielfaches der natürlichen Nukleotide bildet und einen großen Einfluß auf die Nuk- Komponente ausübt.
- Einsatzgebiete der Nuk-Makromoleküle:**
- Die Kopplung eines makromolekularen Markers an ein Substrat für Enzyme, an ein Nukleotid, bietet die Möglichkeit eines breiten Einsatzes dieser Nuk-Makromoleküle in unterschiedlichen Anwendungen in der Biotechnologie, Medizin und Wissenschaft.
- 30 Erfindungsgemäß können Nuk-Makromoleküle in Verfahren eingesetzt werden, bei denen Sie als Substrate für Enzyme dienen.
- 35 In einer Ausführungsform der Erfahrung werden Nuk-Makromoleküle in den Verfahren zur Markierung von Nukleinsäuren eingesetzt. Dabei erfolgt eine Einbaureaktion von Nuk-Makromolekülen nach allgemeinen Regeln der enzymatischen

Verlängerungsreaktion von Nukleinsäureketten, ("Molecular Cloning", Maniatis, 3. Ed. 2001).

Der große Vorteil eines makromolekularen Markes pro ein eingebautes Nukleotid liegt  
5 in einer wesentlich höheren Signalstärke im Vergleich zu herkömmlichen modifizierten Nukleotiden.

Ein weiterer Vorteil ist die große Distanz des Markers von dem Nukleinsäurestrang, so daß keine direkte Wechselwirkung zwischen dem Marker und dem Nukleinsäurestrang  
10 stattfinden. Das hat Einfluß beispielsweise auf die Fluoreszenzeigenschaften der Marker: Die Fluoreszenz der Marker wird von den Nukleobasen (Purine und Pyrimidine) nicht gequencht.

Die Möglichkeit, an einem Strangende einen starken signalgebenden Marker zu positionieren, z.B. durch die Kopplung durch die Terminale Transferase (s. Beispiel 35), beseitigt die Notwendigkeit, den Strang durchgehend zu mit konventionell modifizierten Nukleotiden zu markieren, sodaß native Stränge der Nukleinsäuren zur Verfügung stehen.  
15

Erfolgt die Markierung einer Nukleinsäurekette beispielsweise während der enzymatischen Synthese dieser Kette durch den Einbau von Nuk-Makromolekülen, so sind keine weiteren mehrstufigen Signalamplifikationsschritte mehr notwendig. Viele der bekannten Signalamplifikationsschritte, z.B. Biotin-Streptavidin-Antikörper, oder Digoxigenin-Antikörper I -Antikörper II laufen mit nur mäßigen Ausbeuten ab, wie z.B. Signalamplifikationen bei FISH-Analysen. Schwankende und schwache Ausbeuten in der Markierung verursachen ebenfalls Schwankungen und Schwäche im Signal, was zu Fehlinterpretationen führen kann. Durch den Einsatz von Nuk-Makromolekülen kann die Schäfe der Markierung beseitigt werden. Durch den Einsatz von Nuk-Makromolekülen mit konstanten Signalmengen können auch die Schwankungen  
20 weitgehend ausgeglichen werden.

Die Markierung von Nukleinsäuren kann in unterschiedlichen Verfahren eingesetzt werden. Die konkreten Bedingungen der Nukleinsäurevorbereitung, die Reihenfolge der enzymatischen Schritte und Detektionsvorgänge hängen im einzelnen vom Verfahren ab, in dem die Markierung eingesetzt wird.

### **Verfahren in der Flüssigphase**

In einer Ausführungsform der Markierungsverfahren befinden sich die zu markierenden Nukleinsäureketten in der Flüssigphase, s. Beispiel 34, 35.

Auch andere Verfahren, z.B. PCR, können mit erfindungsgemäßen Nuk-

5 Makromolekülen durchgeführt werden.

Die auf diese Weise markierten Nukleinsäureketten können beispielsweise als Sonden für die Hybridisierung an andere Nukleinsäuren eingesetzt werden.

### **Festphasenverfahren**

10 In einer weiteren Ausführungsform der Markierungsverfahren befinden sich die zu markierenden Nukleinsäureketten an einer festen Phase. Beispiele dafür stellen Mikrokügelchen (SpheroTech Inc, Streptavidin-polystyrene Particle, 2.17 $\mu$ ), Beispiel 34C, und an einer planen Oberfläche gebundene Nukleinsäuren.

15 Insbesondere eignen sich die Nuk-Makromoleküle für Analysenverfahren mit Einbau in die an eine festen Phase gekoppelten Nukleinsäuren, wie beispielsweise Minisequencing (Suomalainen A et al. Methods Mol Biol. 2003;226:361-6. Liljedahl U et al. Pharmacogenetics. 2003 Jan;13(1):7-17, Olsson C et al. Methods Mol Biol. 2003;212:167-76), Primer-Extension (Pirring MC et al. Bioorg Med Chem Lett. 2001 Sep 17;11(18):2437-40, Cai H, et al. Genomics. 2000 Jun 1;66(2):135-43., Kurg A et al. Genet Test. 2000;4(1):1-7., Pastinen T et al. Genome Res. 1997 Jun;7(6):606-14). US pat. 6287766, US pat. 2003148284, US pat. 2003082613, EP 1256632, WO0194639. Single-Molecular-Sequencing (Tcherkassov WO 02088382, Seeger WO 0018956, Kartalov WO 02072892).

25 Nuk-Makromoleküle mit Nuk-Komponente einer Art (beispielsweise dT) tragen vorzugsweise eine für sie spezifischen Marker-Komponente, so daß beispielsweise 4 Arten der Nuk-Makromoleküle (entsprechend dem dT, dC, dA und dG-Basen) gleichzeitig eingesetzt und unterschieden werden können. Andere Markierungsschema 30 sind in bekannt Tcherkassov WO 02088382. Je nach Verfahren werden auch nicht markierte, natürliche Nukleotide in das Reaktionsgemisch zusammen mit den Nuk-Makromolekülen zugegeben.

35 In einer Ausführungsform der Markierungsverfahrens werden Nuk-Makromoleküle eingesetzt, die den Einbau nur einer einzelnen Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäure-Strang erlauben und der mehrfache Einbau durch Modifikationen an der Nuk-Komponente, und/oder der Linker-Komponente und/oder der Marker-Komponente verhindert wird. Der weitere Einbau kann sowohl reversibel als auch irreversibel

verhindert werden. Im Falle eines reversiblen Stops kann er in einem weiteren Verfahrensschritt aufgehoben werden, so daß weitere Einbaureaktionen stattfinden können. Beispiele für eine reversible Blockade der Reaktion sind in Anmeldungen (Metzker et al. Nucleic acid Research 1994, V.22, S. 4259, Canard et al. Gene, 1994,

- 5 V. 148, 1, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642.Tcherkassov WO 02088382) beschrieben.

In einer anderen Ausführungsform können weitere Nukleotide nach dem Einbau von Nuk-Makromolekülen eingebaut werden, so dass auch mehrere Nuk-Makromoleküle in 10 einen komplementären Strang nacheinander eingebaut werden können.

Die feste Phase kann beispielsweise eine plane Oberfläche oder Kugelchen (Beads) oder eine Art von Multigefäßarrays (z.B. Microtiterplatte, Nanotiterplatte) darstellen. Dabei können Nukleinsäuren mit verschiedenen Methoden an die feste Phase gekoppelt werden (McGall et al. US Patent 5412087, Nikiforov et al. US Patent 5610287, Barrett et al. US Patent 5482867, Mirzabekov et al. US Patent 5981734, "Microarray biochip technology" 2000 M.Schena Eaton Publishing, "DNA Microarrays" 1999 M. Schena Oxford University Press, Rasmussen et al. Analytical Biochemistry v.198, S.138, Allemand et al. Biophysical Journal 1997, v.73, S.2064, Trabesinger et al. Analytical 20 Chemistry 1999, v.71, S.279, Osborne et al. Analytical Chemistry 2000, v.72, S.3678, Timofeev et al. Nucleic Acid Research (NAR) 1996, v.24 S.3142, Ghosh et al. NAR 1987 v.15 S.5353, Gingeras et al. NAR 1987 v.15 S.5373, Maskos et al. NAR 1992 v.20 S.1679). Vorzugsweise sind die zu analysierenden Nukleinsäuren mit einem Primer versehen ("Molecular Cloning", Maniatis, 3. Ed. 2001).

25 In einer Ausführungsform des Verfahrens erfolgt die Einbaureaktion von NT-Makromolekülen an einer einzigen Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach dem Einbau am verlängerten Primer verbleibt und nicht abgetrennt wird.

30 In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens erfolgt die Einbaureaktion von NT-Makromolekülen an einer einzigen Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der 35 Einbaureaktion oder nach der Einbaureaktion von der Nuk-Komponente abgetrennt wird.

In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens erfolgt der Einbau von Nuk-Makromolekülen in einer enzymatischen Reaktion parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei diese Populationen adressierbare Positionen an der

- 5 festen Phase haben, wobei die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach dem Einbau am verlängerten Primer verbleibt und nicht abgetrennt wird.

Die adressierbaren Positionen können beispielsweise die Form von Spots haben, im Falle einer planen Oberfläche. Bei der Verwendung von Kugelchen als feste Phase werden unterschiedliche Populationen von Nukleinsäuren an unterschiedlichen

- 10 Kugelchen fixiert. Bei der Verwendung von Multigefäßarrays (z.B. Mikrotiter-Platte, oder Nanotiter-Platte) sind einzelne Nukleinsäurepopulationen in einzelnen Gefäßen getrennt fixiert.

 In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens erfolgt der Einbau von Nuk-

- 15 Makromolekülen in einer enzymatischen Reaktion parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei diese Populationen adressierbare Positionen an der festen Phase haben. Die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls wird während der

- 20 Einbaureaktion oder nach der Einbaureaktion vom Nuk-Teil abgetrennt.

Die adressierbaren Positionen können beispielsweise die Form von Spots haben, im Falle einer planen Oberfläche. Bei der Verwendung von Kugelchen als feste Phase werden unterschiedliche Populationen von Nukleinsäuren an unterschiedlichen Kugelchen fixiert. Bei der Verwendung von Multigefäßarrays sind einzelne Nukleinsäurepopulationen in einzelnen Gefäßen getrennt fixiert.

 In einer Ausführungsform des Verfahrens, werden folgende Schritte durchgeführt:

- a) Bereitstellung mindestens einer Population an einzelsträngigen Nukleinsäureketten

- 30 b) Hybridisierung von sequenzspezifischen Primern an diese Nukleinsäureketten, wobei extensionsfähige NSK-Primer-Komplexe entstehen

- c) Inkubation von mindestens einer Art der Nuk-Makromoleküle nach Aspekten 1 bis 25 zusammen mit einer Art der Polymerase nach Aspekt 31 mit den in Schritten a und b bereitgestellten NSK-Primer-Komplexen unter Bedingungen, die den Einbau von komplementären Nuk-Makromolekülen zulassen, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt.

- d) Entfernung der nicht eingebauten Nuk-Makromoleküle von den NSK-Primer-Komplexen
- e) Detektion der Signale von in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
- 5 f) Entfernung der Linker-Komponente und der Marker-Komponente von den in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
- g) Waschen der NSK-Primer-Komplexe
- gegebenenfalls Wiederholung der Schritte (c) bis (g),
- 10 In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens erfolgt die Einbaureaktion von NT-Makromolekülen gleichzeitig an einer Population unterschiedlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei diese Nukleinsäuremoleküle in einer zufälligen Anordnung an die feste Phase gebunden sind (Tcherkassov WO 02088382). Bei diesem Verfahren werden Sequenzen von einzelnen Nukleinsäurekettenmolekülen ermittelt. Die an der enzymatischen Reaktion teilnehmende Primer-Nukleinsäurekomplexe sind in einer Dichte fixiert, die die Detektion der Signale von einzelnen Nuk-Makromolekülen ermöglicht, die an ein einzelnes Nukleinsäure-Molekül gekoppelt sind, wobei die Dichte der fixierten Primer oder Nukleinsäuren wesentlich höher liegen kann. Beispielsweise beträgt die Dichte der an der Einbaureaktion 15 teilnehmenden Primer-Nukleinsäurekomplexe von 1 Komplex auf  $10\mu\text{m}^2$  bis 1 Komplex auf  $100\mu\text{m}^2$ , von 1 Komplex auf  $100\mu\text{m}^2$  bis 1 Komplex auf  $1000\mu\text{m}^2$ , von 1 Komplex auf  $1000\mu\text{m}^2$  bis 1 Komplex auf  $10.000\mu\text{m}^2$ . Beispiele der Fixierung der Nukleinsäuren an die feste Phase mit einer Auflösung, die Analysen an einzelnen Molekülen erlaubt sind in WO0157248, US2003064398, 20 US2003013101 und WO 02088382 dargestellt. Eine passende Detektionsapparatur ist in der Anmeldung WO 03031947 beschrieben.
- 25 Die Zahl der parallel zu analysierenden einzelnen Nukleinsäuremoleküle liegt beispielsweise zwischen 1000 und 100.000, 10.000 bis 1.000.000, 100.000 bis 30 10.000.000 Moleküle. Wobei die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker- Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Einbaureaktion oder nach der Einbaureaktion von der Nuk- Komponente abgetrennt wird..
- Dieses Verfahren zur parallelen Sequenzanalyse von Nukleinsäuresequenzen 35 (Nukleinsäureketten, NSKs) schließt folgende Schritte ein, man:

Fragmente (NSKFs) einzelsträngiger NSKs mit einer Länge von etwa 50 bis 1000 Nukleotiden erzeugt, die überlappende Teilsequenzen einer Gesamtsequenz darstellen können, man

- 5            die NSKFs unter Verwendung eines einheitlichen oder mehrerer unterschiedlichen Primer in Form von NSF-Primer-Komplexen auf einer Reaktionsoberfläche in einer zufälligen Anordnung bindet, wobei die Dichte der an die Oberfläche gebundenen NSF-Primer-Komplexen eine optische Detektion der Signale von einzelnen eingebauten Nuk-Makromolekülen zuläßt, man
- 10            eine zyklische Aufbaureaktion des komplementären Stranges der NSKFs unter Verwendung einer oder mehrerer Polymerasen durchführt, indem man
- 15            a) zu den auf der Oberfläche gebundenen NSF-Primer-Komplexen eine Lösung zugibt, die eine oder mehrere Polymerasen und ein bis vier Nuk-Makromoleküle enthält, die eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Marker-Komponente haben, wobei die bei gleichzeitiger Verwendung von mindestens zwei Nuk-Makromoleküle jeweils an die Marker-Komponente befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe so gewählt sind, dass sich die verwendeten Nuk-Makromoleküle durch Messung unterschiedlicher Fluoreszenzsignale voneinander unterscheiden lassen, wobei die Nuk-Makromoleküle strukturell so modifiziert sind, dass die Polymerase nach Einbau eines solchen Nuk-Makromoleküls in einen wachsenden komplementären Strang nicht in der Lage ist, ein weiteres Nuk-Makromolekül in denselben Strang einzubauen, wobei die Linker-Komponente mit der Marker-Komponente abspaltbar sind, man
- 20            b) die in Stufe a) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen inkubiert, die zur Verlängerung der komplementären Stränge geeignet sind, wobei die komplementären Stränge jeweils um ein Nuk-Makromolekül verlängert werden, man
- 25            c) die in Stufe b) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung nicht in einen komplementären Strang eingebauter Nuk-Makromoleküle geeignet sind, man
- 30
- 35

5           d) die einzelnen, in komplementäre Stränge eingebauten Nuk-Makromoleküle durch Messen des für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Signals detektiert, wobei man gleichzeitig die relative Position der einzelnen Fluoreszenzsignale auf der Reaktionsoberfläche bestimmt, man

10           e) zur Erzeugung unmarkierter (NTs oder) NSKFs die Linker-Komponente und die Marker-Komponente von den am komplementären Strang angefügten Nuk-Komponenten abspaltet, man

15           f) die in Stufe e) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung der Marker-Komponente geeignet sind, man

20           die Stufen a) bis f) gegebenenfalls mehrfach wiederholt,

25           wobei man die relative Position einzelner NSKF-Primer-Komplexe auf der Reaktionsoberfläche und die Sequenz dieser NSKFs durch spezifische Zuordnung der in Stufe d) in aufeinanderfolgenden Zyklen an den jeweiligen Positionen detektierten Fluoreszenzsignale zu den Nuk-Makromolekülen bestimmt.

30           Nach dem Einbau eines Nuk-Makromolekül an das 3`-Ende der Nukleinsäure behalten die nun ihrerseits modifizierten Nukleinsäureketten überraschenderweise die Fähigkeit zur Kopplung weiterer Nukleotide an die 3`-Hydroxylgruppe durch Polymerasen, s. Beispiel 34C.

35           Dies bedeutet, daß nicht nur die Nuk-Komponente in den Nuk-Makromolekülen sondern auch die mit diesen Nuk-Makromolekülen modifizierten Nukleinsäureketten können, bei entsprechender Struktur der Nuk-Komponente, z.B. freie OH-Gruppe, zugängig für die Enzyme bleiben und in unterschiedlichen Bereichen der Biotechnologie eine Anwendung finden. Beispiele für die Anwendungen von modifizierten Oligonucleotiden sind dem Fachmann bekannt, z.B. in den Primer-Extension-Reaktionen oder Minisequencing-Reaktionen.

### **Wahl der Enzyme:**

35           Nukleotide spielen eine zentrale Rolle in unterschiedlichen Stoffwechselvorgängen, beispielsweise bei der Speicherung und Übertragung der genetischen Information in der Zelle ("Genes V" B. Lewin, 1994). Auch sind Nukleotide als Energieträger der Zelle bekannt (ATP, UTP), oder Signalvermittler (Messenger, GTP) der intrazellulären Signalvermittlung ("Biochemie und Pathobiochemie", G. Löffler, 2003). Aus diesem

Grund werden Nukleotide und ihre Analoga als Therapeutika und Diagnostika eingesetzt.

Nuk-Makromoleküle haben das Potenzial, in unterschiedlichen Bereichen der

- 5 Biotechnologie eine Anwendung zu finden.

Die Möglichkeit einer Kopplung der Nukleotide an ein Makromolekül unter

Beibehaltung der Subrateigenschaften der Nukleotide eröffnet viele Wege auch für  
eine gezielte Adressierung der modifizierten Nukleotiden innerhalb eines Organismus

- 10 oder einer Zelle, so daß Nuk-Makromoleküle ein neues grundsätzliches Model für  
Nukleotid-Prodrugs darstellen.

Als Enzyme können beispielsweise unterschiedliche Sorten von Polymerasen

- 15 verwendet werden ("DNA Replication", Kornberg, 2. Ed. 1992), im einzelnen DNA-  
abhängige DNA-Polymerasen, RNA-abhängige DNA-Polymerasen, DNA-abhängige  
RNA-Polymerasen und RNA-abhängige RNA-Polymerasen. Dabei können sowohl  
thermostabile als auch thermolabile Polymerasen verwendet werden, wie  
beispielsweise Klenow-Polymerase oder Taq-Polymerase. Andere Beispiele für  
mögliche Polymerasen findet ein Fachmann in der hier zitierten Literatur. Ein weiteres  
20 Beispiel für Enzyme stellen Transferasen, wie Terminale Deoxynucleotidyltransferase  
("Molecular Cloning", Maniatis, 3. Ed. 2001), dar. Auch andere Enzyme und Proteine  
(beispielsweise Kinasen, Membranrezeptoren) die Nukleotide als Substrate),  
Energiequelle, Cofaktoren oder als Messenger-Substanzen akzeptieren können  
verwendet werden.

25 Enzyme unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, modifizierte Nukleotide als Substrate zu  
akzeptieren. In dieser Anmeldung werden nur DNA-Polymerasen als Beispiel  
angegeben. Einem Fachmann sollte es naheliegend erscheinen, daß verschiedene  
funktionelle Tests eingesetzt werden müssen, um bestimmte Eigenschaften von

- 30 Nukleotiden zu untersuchen und anzuwenden. Beispiele für unterschiedliche  
Testabläufe für die Markierung von Nukleinsäuren sind in H. Held et al. Nucleic Acid  
Research 2002, V. 30, S. 3857, M. Metzger et al. Nucleic Acid Research 1994, V. 22,  
4259, M. Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta 1994, V.77, S. 586 , B. Canard et al.  
PNAS 1995, V. 92, S. 10859 (3'-Ester), Canard US 5798210, J. Hovinen et al. J.  
35 Chem. Soc. Perkin 1994, 1994, 211 und auch in anderen hier zitierten Patenten und  
Publikationen angegeben.

Die passenden Kombinationen zwischen Polymerasen und modifizierten Nukleotiden können für den jeweiligen Zweck entsprechend gewählt werden. Beispiele für den Einbau von Nuk-Makromolekülen in die Primer sind in Beispiel 34 angegeben. Die angegebenen Beispiele dienen nicht zur Einschränkung der Verwendungsmöglichkeit

- 5 von Nuk-Makromolekülen, sondern sollten dem Fachmann den Unterschied in Eigenschaften der Nuk-Makromoleküle zu den konventionellen modifizierten NT darstellen.

10 Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenprodukte können auch in der konventionellen chemischen Oligonucleotidsynthese verwendet werden, beispielsweise in einer

- Festphasensynthese (Giegrich, "Neue photolabile Schutzgruppen für die lichtgesteuerte Oligonucleotidsynthese", 1997, Beler, "Neue Strategien zum Aufbau von RNA- und DNA-Oligonucleotiden", 1996), dabei trägt die Nuk-Komponente der Nuk-Makromoleküle entsprechende Modifikationen, die eine chemische Kopplung an die Nukleinsäurekette erlaubt, wie beispielsweise in Herrlein, "Synthese von modifizierten Nukleosiden, Nukleotiden und Oligonukleotiden", 1993, Gugler, "Aufbau und Anwendung von Systemen zur vereinfachten chemo-enzymatischen Synthese von Oligonukleotid-Hybridisierungssonden", 1993, Schmidt, "Neue Methoden zur Synthese und Isolierung langkettiger Oligonucleotide", 1991, Bühler, "Neue photolabile
- 20 Schutzgruppen für die Oligonucleotidsynthese", 2000, Bretzger, "Wege zur präparativen Oligonucleotidsynthese" 1991, Stengele, "Automatisierte Oligonucleotidsynthese unter Verwendung [ $\beta$ ]-eliminierbare Schutzgruppen", 1991).

- 25 Ähnlich zu enzymatisch synthetisierten Nukleinsäureketten (wobei sowohl Oligo- als auch Polynukleotide eingesetzt werden können) behalten die chemisch synthetisierten Oligo- bzw. Polynukleotide ihre Fähigkeit zur Kopplung weiterer Nukleotide an die 3'-Hydroxylgruppe bei. Somit können sie in unterschiedlichen Bereichen der Biotechnologie beispielsweise als Primer eingesetzt werden.

- 30 **Allgemeine Hinweise für die Synthesen von Nuk-Makromolekülen**  
 Die erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle können auf unterschiedliche Art und Weise synthetisiert werden. Die Reihenfolge der Kopplungsschritte kann variieren. Beispielsweise kann zunächst eine Linker-Komponente an die Nuk-Komponente gekoppelt werden, anschließend wird die Marker-Komponente gekoppelt. Andererseits können ein oder mehrere Linker an die Marker-Komponente gekoppelt werden und anschließend der / die Nuk-Komponenten.

Die Kopplung zwischen einzelnen Komponenten der Nuk-Makromoleküle kann kovalent oder affin erfolgen. Wobei sowohl chemische als auch enzymatische Kopplung zur Verknüpfung einzelner Komponenten eingesetzt werden kann. Kopplungen an Amino- und Thiolgruppen dienen als Beispiele für kovalente Kopplungen (D. Jameson et al.

- 5 Methods in Enzymology 1997, V. 278, 363, "The chemistry of the amino group" S. Patai, 1968, "The chemistry of the thiol group" S. Patai, 1974). Biotin-Streptavidin-Bindung oder Hybridisierung zwischen komplementären Nukleinsäuresträngen oder Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen stellen Beispiele für affine Kopplungen dar.
- 10 Die makromolekularen Marker bieten oft eine Vielfalt an Kopplungsmöglichkeiten. Ein makromolekularer Marker kann mehrere Kopplungsstellen für den Linker haben, beispielsweise mehrere Bindungsstellen für Biotin, wie es bei Streptavidin der Fall ist. Ein makromolekularer Marker kann auch mehrere Amino- bzw. Thiol-Gruppen aufweisen.
- 15 Falls Nukleinsäuren als makromolekulare Marker eingesetzt werden, so können diese unterschiedliche Abschnitte zur Kopplung anderer Makromoleküle besitzen. An einen makromolekularen Marker können andere Makromoleküle gebunden werden, z.B. Enzyme. Ein Nuk-Makromolekül kann makromolekulare Marker mit unterschiedlichen
- 20 Detektionseigenschaften tragen, beispielsweise kann ein Nuk-Makromolekül sowohl mehrere Farbstoffmoleküle als auch Stellen zur affinen Bindung (z.B. durch Hybridisierung) weiterer Makromoleküle tragen.
- 25 Die Kopplung zwischen der Nuk-Komponenten und der Linker-Komponenten erfolgt vorzugsweise kovalent. Viele Beispiele für eine kovalente Kopplung an Nukleotide oder deren Analoga sind bekannt (Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, v. 278, S. 363-, Held et al. Nucleic acid research, 2002, v. 30 3857-, Short US Pat. 6579704, Odedra WO 0192284). Dabei kann die Kopplung beispielsweise an Phosphat, Amino-, Hydroxy- oder Mercaptogruppen erfolgen.
- 30 Oft kann die Linker-Komponente in mehreren Schritten aufgebaut werden. Beispielsweise wird im ersten Schritt ein kurzer Linker mit einer reaktiven Gruppe an das Nukleotid angekoppelt, z.B. Propargylamin-Linker an Pyrimidine Hobbs et al. US Patent 5.047.519 oder andere Linker z.B. Klevan US.Pat. 4,828,979, Seela US pat. 6211158, US pat. 4804748, EP 0286028, Hanna M. Method in Enzymology 1996 v.274,
- 35 S.403, Zhu et al. NAR 1994 v.22 S.3418, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, v. 278, S. 363-, Held et al. Nucleic acid research, 2002, v. 30 3857-, Short US Pat. 6579704, Odedra WO 0192284, Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta, 1994, V. 77, S. 586, Canard US. Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO

01/25247, Parce WO 0050642. Einige Verbindungen kann man käuflich erwerben, z.B. bei Trilink Biotechnologies, Eurogentec, Jena Bioscience.

Diese kurzen Linker dienen als Kopplungseinheiten L oder deren Teile, und sind ein Bestandteil der Linker-Komponente im fertigen Nuk-Makromolekül.

- 5 Im zweiten Schritt kann die Kopplung des Nukleotides mit einem kurzen Linker an das Polymer erfolgen. Polymere mit reaktiven funktionellen Gruppen können käuflich erworben werden (Fluka).
- Nach der Kopplung des Nukleotids an das Polymer kann nun die Marker-Komponente als letzter Schritt gekoppelt werden.

10

Einem Fachmann sollte es naheliegend erscheinen, dass auch modifizierte Nukleoside (erhältlich beispielsweise bei Trilink Biotechnologies, Eurogentec) in die Synthesen eingesetzt werden können.

15

Die Kopplung zwischen der Linker-Komponente und der Marker-Komponente kann beispielsweise zwischen reaktiven Gruppen an der Linker-Komponente und der Marker-Komponente erfolgen. Reagenzien für solche Kopplungen sind in "Chemistry of protein conjugation and cross-linking", S. Wang, 1993, ISBN 0-8493-5886-8, ausführlich dargestellt. Die Verfahren zur Handhabung und zur Kopplung von mehreren Makromolekülen sind für unterschiedliche Typen von Makromolekülen auch 20 in oben genannten Patenten dargestellt. Weitere Beispiele für Kopplungen an die und zwischen den Makromolekülen sind für Proteine in "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2; "Reactive dyes in protein and enzyme technology", D. Clonis, 1987, ISBN 0-333-34500-2; "Biophysical labeling methods in molecular biology" G. Likhtenshtein, 1993, 1993, 25 ISBN 0-521-43132-8; "Techniques in protein modification" R. Lundblad, 1995, ISBN 0-8493-2606-0; "Chemical reagents for protein modification" R. Lundblad, 1991, ISBN 0-8493-5097-2; für Nukleinsäuren in "Molecular-Cloning", J. Sambrook, band 1-3, 2001, ISBN 0-87969-576-5, für andere Polymerarten "Makromoleküle, Chemische Struktur und Synthesen", Band 1, 4, H. Elias, 1999, ISBN 3-527-29872-X 30 beschrieben.

Da die Marker-Komponente meistens viele Kopplungsstellen aufweist, können weitere Modifikationen an kompletten Nuk-Makromolekülen vorgenommen werden.

Beispielsweise können überschüssige Amino-Gruppen abgeblockt werden oder durch 35 weiterführende Modifikationen verändert werden.

Je nach Einsatzgebiet und Reaktionsbedingungen, unter denen Nuk-Makromoleküle verwendet werden, können unterschiedliche chemische Bindungsarten zwischen

einzelnen Teilen der Makromoleküle von Vorteil sein. So eignen sich beispielsweise bei Verfahren mit Schritten mit höheren Temperaturen, wie z.B. bei Hybridisierung oder PCR, Nuk-Makromoleküle, die kovalente, thermostabile Bindungen zwischen einzelnen Teilen haben.

- 5 Nachfolgend sollen beispielhaft einige Möglichkeiten zur Synthese von Nuk-Makromolekülen dargestellt werden. Diese dienen nicht zur Einschränkung der möglichen Synthesewege und nicht zur Einschränkung der möglichen Nuk-Makromolekülstrukturen.
- 10 In folgenden Beispielen werden Nuk-Makromoleküle mit Polyethylenglycol (PEG) als Linker-Komponente angegeben. Beispiele für die Kopplungen von PEG an andere Moleküle sind in "Poly(ethylene glycol) : chemistry and biological applications", 1997 beschrieben. Im einzelnen können sehr unterschiedliche reaktive Gruppen zur Kopplung eingesetzt werden: N-succinimidyl carbonate ( U.S. Pat.. 5,281,698, US 5,468,478), Amine (Buckmann et al. Makromol. Chem. V.182, S.1379 (1981), Zalipsky et al. Eur. Polym. J. V.19, S. 1177 (1983)), succinimidyl propionate und succinimidyl butanoate (Olson et al. In Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; U.S. Pat. No. 5,672,662), Succinimidyl succinate (Abuchowski et al. Cancer Biochem. Biophys. v. 7, S.175 (1984), Joppich et al., Makromol. Chem. 1v. 80, S.1381 (1979), Benzotriazole carbonate (U.S. Pat. No. 5,650,234), Glycidylether (Pitha et al. Eur. J. Biochem. v. 94, S.11 (1979), Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. v.13, S. 354 (1991), Oxycarbonylimidazole (Beauchamp, et al., Anal. Biochem. v.131, S. 25 (1983), Tondelli et al. J. Controlled Release v.1, S.251 (1985)), p-nitrophenyl carbonate (Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., v.11, S.141 (1985); and Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech., v.27, S.45 (1991)), Aldehyde (Harris et al. J. Polym. Sci. Chem. Ed. v.22, S. 341 (1984), US. Pat. 5824784, US. Pat. 5252714), Maleimide (Goodson et al. Bio/Technology v.8, S. 343 (1990), Romani et al. in Chemistry of Peptides and Proteins v.2, S.29 (1984)), and Kogan, Synthetic Comm. v.22, S.2417 (1992)), Orthopyridyl-disulfide (Woghiren, et al. Bioconj. Chem. v. 4, S. 314 (1993)), Acrylol (Sawhney et al., Macromolecules, v. 26, S.581 (1993)), Vinylsulfone (U.S. Pat. No. 5,900,461). Weitere Beispiele für Kopplungen von PEG an andere Moleküle sind in Roberts et al. Adv. Drug Deliv. Reviews v. 54, S. 459 (2002), US 2003124086, US 2003143185, WO03037385, US6541543, US 2003158333, WO 0126692 zu finden.
- 25 30 35 Andere ähnliche Polymere können in ähnlicher Art gekoppelt werden. Beispiele für solche Polymere stellen andere Poly(Alkylenglykole), Copolymeren aus Ethylenglykol und Propyleneglykol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone),

Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(saccharide), Poly(x-Hydroxy-Säuren), Poly(Acrylicsäure), Poly(Vinylalkohol).

Die Aufreinigung der Nuk-Komponenten der Nuk-Makromoleküle erfolgt mit

- 5 konventionellen Mitteln der Nukleotidchemie: beispielsweise mit Kieselgel-Chromatographie in einem Wasser-Ethanol-Gemisch, Ionenaustausch-Chromatographie in einem Salz-Gradienten und Reverse-Phase-Chromatographie in einem Wasser-Methanol-Gradienten. Für die Nukleotid-Aufreinigung optimierte Chromatographie-Säulen werden z.B. von der Firma Sigma-Aldrich angeboten.

- 10 Die Aufreinigung von makromolekularen Linker-Komponenten und Marker-Komponenten kann durch Ultrafiltration, Gel-Elektrophorese, Gelfiltration und Dialyse erfolgen, siehe "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2.

- 15 Die Masse der Nuk-Makromoleküle unterscheidet sich wesentlich von der Masse der Nukleotide. Aus diesem Grund ist es vorteilhaft, bei den Endreinigungsschritten die Ultrafiltration einzusetzen. Da für die Nuk-Makromoleküle nur eine durchschnittliche Masse berechnet wird, eignet sich Ultrafiltration auch als analytische Methode zu Trennung von Syntheseprodukten.

- 20 Zur Charakterisierung der Nuk-Makromoleküle können unterschiedliche Methoden der makromolekularen Chemie angewendet werden, z.B. UV-Vis-Spektroskopie, Fluoreszenzmessung, Massenspektroskopie, Fraktionierung, Größenausschlußchromatographie, Ultrazentrifugation und elektrophoretische

- 25 Techniken, wie IEF, denaturierende und nicht denaturierende Gel-Elektrophorese ("Makromoleküle, Chemische Struktur und Synthesen", Band 1, 4, H. Elias, 1999, ISBN 3-527-29872-X, "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2).

- Die Messung von freien SH-Gruppen in einer Substanz erfolgte mit Ellmans Reagenz  
30 (5,5`-Dithiobis (2-Nitrobenzolsäure), Riddles et al. Method in Enzym. 1983, V.91, S. 49.

### 3. Synthesen von modifizierten Nukleotiden

#### Trennungsmethoden:

Dünnschichtchromatographie, DC:

- 5 Analytisch: „DC-Alufolien 20 x 20 cm Kieselgel 60 F 254“ (VWR), beschichtet mit Fluoreszenzindikator. Visualisierung erfolgt mittels UV-Licht. Laufmittel Ethanol-Wasser-Gemisch (70:30) (Laufmittel, LM 1) oder Ethanol-Wasser-Gemisch (90:10) (LM 2).

Präparativ: Kieselgel-Glasplatten mit Sammelschicht (VWR). LM 1 oder LM 2.

10

Umkehrphasen-Chromatographie (RP-Chromatographie), RP-18:

C-18 Material (Fluka), Säulenvolumen 10ml, Wasser-Methanol-Gradient. Fraktionen je 1ml wurden gesammelt und mit UV-Vis-Spektrometer analysiert. Fraktionen mit ähnlichen Spektren wurden vereinigt und lyophilisiert.

15

HPLC-Säulen mit ähnlichem Material können verwendet werden (Sigma).

#### Ionenaustausch-Chromatographie

DEAE-Zellulose (VWR), Gradient NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 20mmol/l - 1mol/l, Fraktionen wurden unter UV/Vis -Kontrolle gesammelt und auf Grundlage gleicher Spektren vereinigt.

20

Die Affinitätsisolierung von Nuk-Makromolekülen kann beispielsweise eingesetzt werden, wenn Nuk-Makromoleküle Oligonukleotide Bestandteil der Marker-Komponente sind. Durch die Hybridisierung an eine komplementäre, auf einer festen Phase fixierte Nukleinsäure können sie selektiv isoliert werden.

25

Die Bestimmung der Ausbeuten für farbstoffmarkierte Produkte erfolgte an UV-Vis-Spektrometer.

30

Die Vollständigkeit der Kopplung an Streptavidin wurde durch eine Kontrolltitration mit einem Biotin-Farbstoff (Biotin-4-Fluoreszein, Sigma) 100 µmol/l in 50 mmol/l Borat, pH 8, 5 min bei RT durchgeführt. Bei einer kompletten Besetzung von Biotin-Bindungsstellen an Streptavidin während der Synthese erfolgt keine Markierung von Streptavidin. Bei einer nicht ausreichenden Reaktion erfolgt eine Bindung an SA. Analyse mit UV-Vis.

35

**Material:**

- Diamino PEG 10.000 (Diamino-Polyethylenglycol 10.000, Sigma), dUTP-AA (dUTP-Allylamine, Jena-Bioscience), TTP (Thymidin-Triphosphat, kann auch als dTTP gekennzeichnet werden, Sigma), 3'-Amino-TTP (3'-Amino-3'-deoxy-Thymidin-Triphosphat, Trilink), PDTP (3-(2-Pyridinyl-dithio)-propionsäure), PDTP-NHS (3-(2-Pyridinyl-dithio)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Sigma), Cy3 (Farbstoff, Amersham Bioscience), Cy3- NHS (Cy3- N-hydroxysuccinimidyl-ester, Amersham Bioscience), MEA (Mercaptoethylamine, Sigma), CA (Cystamine, Sigma), TCEP - (Tris-(2-carboxyethyl)phosphine, Sigma), DTBP (3,3'-Dithio-Bis-Propionsäure, Fluka), Biotin-NHS (Biotin-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Sigma). J-Ac (Iodoacetat, Sigma), TEAE (Tris-(2-Aminoethyl)amine, Sigma), Maleimido-ES-NHS (Maleimido-Essigsäure-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Sigma), EDA (Ethylendiamin, Sigma), CDI (1,1'-Carbonyldiimidazol, Sigma), NHS-PEG-Maleimid, 3.400 Da, Biotin-PEG-NHS, 5.000 Da (Nektar Molecular engineering), 3'-Biotin-dT31 ein Oligonucleotid mit einer Sequenz aus 31 Thymidinmonophosphaten, mit einem Biotin-Molekül am 3'-Ende (MWG-Biotech, Deutschland), 3'-SH-Oligo-dT30 ein Oligonucleotid mit einer Sequenz aus 30 Thymidinmonophosphaten, mit einer Merkaptogruppe am 3'-Ende (MWG-Biotech, Deutschland), SA (Streptavidin, Roche), SA-Cy2 (mit Cy2-Farbstoff modifiziertes Streptavidin, Amersham). QDot (Qdot 605 Streptavidin Conjugat, Quantum Dot).
- Poly-Lysin 1000 - 2000 (Poly-L-lysin-hydrobromid 1000 -2000 Da, Fluka), Poly-Lysin 10.000 - 20.000 (Poly-L-lysin-hydrobromid 10.000 -20.000 Da, Fluka).

Lösungsmittel wurden, wenn nötig, absolutiert verwendet (Fluka) oder nach Standardverfahren getrocknet. Bei Lösungsmittelgemischen beziehen sich die angegebenen Mischungsverhältnisse auf die eingesetzten Volumina (v/v).

**Synthese einzelner Komponenten:****Beispiel 1:**

- dUTP-AA-PDTP, Fig 10A.
- 20 mg dUTP-AA wurden in 1ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 8.5 eingestellt. Zur dUTP-AA - Lösung wurde PDTP-NHS 60mg in 0.5 ml Methanol, tropfenweise unter Rühren zugegeben. Reaktion wurde 2 h bei 40°C durchgeführt. DC-Kontrolle: dUTP-AA-PDTP (in LM 1 Rf 0.45). Die Trennung von überschüssigem PDTP-NHS und PDTP erfolgte auf präparativen Kieselgel-Platten, LM 2. Das Produkt, dUTP-AA-PDTP, und dUTP-AA bleiben auf der Startlinie. Die Nukleotide wurden von der Platte mit Wasser eluiert und eingeengt.

Dieses dUTP-Analog trägt nun eine Disulfid-Bindung, die in einer Thiolaustauschreaktion mit anderen Thiolen reagieren kann und eine unter milden Bedingungen spaltbare Verbindung darstellt.

- 5 Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 7-Deaza-Aminopropargyl Guanosin-Triphosphat und 7-Deaza-Aminopropargyl Adenosintriphosphate können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide
- 10 verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

#### **Beispiel 2:**

dCTP-PA-PDTP, Fig. 10B

Die Synthese wurde wie für dUTP-AA-PDTP, Beispiel 1, beschrieben durchgeführt.

15

#### **Beispiel 3:**

dUTP-AA-Propionat-SH, Fig. 15

Zu 200µl 40mmol/l Lösung von dUTP-AA-PDTP wurde 1ml TCEP-Lösung 250mmol/l, pH 8, eingestellt mit NaOH, zugegeben und 10 min bei RT gerührt.

- 20 Die Trennung der Nukleotide von anderen Reagenzien erfolgte auf präparativen Kieselgel-Platten, LM 2. Produkt, dUTP-AA-Propionat-SH und dUTP-AA, bleiben auf der Startlinie. Die Nukleotide wurden von der Platte mit Wasser eluiert und eingeengt. Dieses dUTP-Analog trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

25

#### **Beispiel 4:**

Biotin-PEG-Ethyl-SH, Fig. 16

Zu 200 µl wässriger CA-Lösung (100mmol/l), pH 8.5, eingestellt mit NaOH, wurden 10 mg Biotin-PEG-NHS zugegeben und bei 40°C 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde 30 200 µl TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde durch Ultrafiltration auf 3.000 MWCO (Molecular weight cut off) von anderen Reagenzien getrennt. Ausbeute 35%.

- Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.
- 35

**Beispiel 5:**

Bis-Dithio-(Ethyl-PEG-Biotin),

Zu 1 ml wässriger CA-Lösung (2 mmol/l), pH 8.5 mit NaOH eingestellt, wurden 100mg Biotin-PEG-NHS zugegeben und bei RT 18 Stunden gerührt. Das Produkt wurde durch

- 5 Ultrafiltration auf 10.000 MWCO von anderen Reagenzien getrennt und lyophilisiert.  
Ausbeute 13%.

Das Produkt besitzt eine Disulfid-Verbindung, die an Thiolaustauschreaktionen teilnehmen kann.

**10 Beispiel 6:**

MEA-Cy3, Fig. 17

Zu 1ml wässriger CA-Lösung, 200 mmol/l, pH 8.5 eingestellt mit NaOH, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 10 mmol/l betrug. Die

- 15 Reaktion wurde 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurde 1 ml TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0 eingestellt mit NaOH, zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde auf RP-18 getrennt (Wasser-Methanol-Gradient) und auf 0.5ml eingeengt, Ausbeute 93%, UV-Vis.

Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann,

- 20 beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

**Beispiel 7:**

Cy3-TEAE, Fig. 18

Zu 1ml wässriger TEAE-Lösung, 300 mmol/l, pH 8.5 mit NaOH eingestellt, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 5mmol/l betrug . Die Reaktion wurde 10 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde auf RP-18 getrennt und auf 0.5ml eingeengt, Ausbeute 82%, UV-Vis.

Das Produkt hat zwei Aminogruppen, die leicht mit anderen Reagentien modifiziert werden können und neue Funktionalitäten an den Farbstoff koppeln können.

30

**Beispiel 8:**

Cy3-TEAE-Propionat-SH, Fig. 19

Zu 300 $\mu$ l wässriger Cy3-TEAE, 2mmol/l, pH 7.5, wurden langsam 30 $\mu$ l einer frisch bereiteten methanolischen Lösung von PDTP-NHS, 30mmol/l, zugegeben. Der Ablauf

- 35 der Reaktion wurde durch DC, LM 1, kontrolliert. Als Reaktionsprodukte erscheinen auf DC Substanzen (LM 1) mit Rf. 0.55 (Cy3-TEAE-PDTP) und 0.95 (Cy3-TEAE-(PDTP)2). Nach Ablauf von 1 h wurde die Reaktion gestoppt und die Produkte auf DC mit LM 1 getrennt. Die Substanz mit Rf. 0.55 wurde isoliert, eingeengt und in 200 $\mu$ l Wasser

aufgelöst. Zu dieser Lösung wurde 0.1ml TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt, Cy3-TEAE-Propionat-SH, wurde auf RP-18 getrennt (Wasser-Methanol-Gradient) und auf 0.5ml eingeengt, Ausbeute 26%, UV-Vis.

- 5 Das Produkt trägt einerseits eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung, andererseits eine Amino-Gruppe, die mit anderen Reagentien reagieren kann.

**Beispiel 9:**

- 10 TEAE-(Cy3)2, Fig. 20

Zu 1ml wässriger TEAE-Lösung, 2 mmol/l, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 4mmol/l betrug. Die Reaktion wurde 10 min bei RT gerührt. Das Produkt (Rf. 0.45) wurde auf präparat. Kieselgel DC mit LM 1 von anderen Reaktionsprodukten getrennt, mit 50mM Borat-Puffer, pH 9, eluiert, danach auf RP-18 gesammelt und anschließend mit 50% Et-OH eluiert und auf 0.5ml eingeengt, Ausbeute 22%, UV-Vis.

**Beispiel 10, Fig. 21**

Poly-Lysin-(Cy3)n, n = 10-15, Poly-Lysin 10.000-20.000

- 20 Zu 1ml wässriger Poly-Lysin-Lösung, 1 mmol/l, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 18mmol/l betrug. Die Reaktion wurde 40 min bei RT gerührt. Die Trennung von modifiziertem Poly-lysin von Farbstoffresten erfolgte durch Ultrafiltration, 3000 MWCO. Bestimmung der durchschnittlichen Zahl Cy3-Moleküle erfolgte über UV-Vis-Spektrometer.

Poly-Lysin stellt ein Beispiel für ein Kern-Komponente dar, an die mehrere Marker-Einheiten, beispielsweise Farbsoffe gekoppelt werden können. In diesem Experiment wurde die Verteilung von Cy3-Molekülen in Poly-Lysin-Population rechnerisch ermittelt, aus den bekannten Größenunterschieden der Poly-Lysin-Moleküle und der mittleren ermittelten Zahl von Cy3-Moleküle.

**Beispiel 11,**

TEAE-(Cy3)2-PDTP und TEAE-(Cy3)2-Propionat-SH, Flg 22:

- Zu 200 $\mu$ l TEAE-(Cy3)2, 1mmol/l wurden 10mg; PDTP-NHS zugegeben und 1 Stunde 35 bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde durch DC, LM 1, kontrolliert. Nach 1 h wurde eine fast quantitative Umsetzung von TEAE-(Cy3)2 (Rf. 0.45) zu TEAE-(Cy3)2-PDTP, (Rf. 0.85) festgestellt. Der Ansatz wurde in zwei gleiche Teile geteilt.

Das Produkt, TEAE-(Cy3)2-PDTP, aus dem ersten Teil wurde auf RP-18 getrennt und lyophilisiert. Ausbeute 82%, UV-Vis.

Das Produkt trägt eine Disulfidbindung, die leicht an einer Thiolautauschreaktion teilnehmen kann und somit an andere Verbindungen gekoppelt werden kann.

- 5 Zum zweiten Teil wurde 0.1ml TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zum Ansatz zugegeben und noch 10 min bei RT gerührt. Das Produkt, TEAE-(Cy3)2-Propionat-SH, wurde auf RP-18 getrennt, Ausbeute 68%, UV-Vis.

- 10 Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

### **Beispiel 12, Fig 23**

(HS-Propionat)m-Poly-Lysin-(Cy3)n, (n = 10-15, m 3-9, Poly-Lysin 10.000-20.000)

- 15 Zu 200µl Poly-Lysin-(Cy3)n, 1mmol/l wurden 10mg, PDTP-NHS zugegeben und 1 Stunde bei RT gerührt. Das Produkt, (PDTP)m-Poly-Lysin-(Cy3)n, wurde durch Ultrafiltration von den PDTP-Resten abgetrennt und anschließend in 100µl Wasser gelöst. Danach wurde 0.1ml TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zum Ansatz zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt, (HS-Propionat)m-Poly-Lysin-(Cy3)n, wurde mit 3.000 MWCO von den niedermolekularen Bestandteilen getrennt.
- 20 Das Produkt trägt mehrere reaktive SH-Gruppen, die leicht modifiziert werden können, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

### **Beispiel 13:**

TTP-3`-O-Propionat-SH, Fig 24A,

- 25 Die Synthese von 3`-modifizierten Nukleotiden erfolgt nach Gottikh et al. Tetrahedron, 1970, v. 26, 4419-, Schäfer et al. Method in Enzymology, 1986, v. 126, S. 682-.
- DTBP, 210 mg, wurden in 1ml DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurde CDI 320mg zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 10µl Methanol zugegeben und nach weiteren 10 min wurden 100µl dieser Lösung, 1mol/l, zu 300µl wässriger 30 100mmol/l-Lösung von TTP, pH 8.5 eingestellt mit NaOH, zugegeben und ca. 4 h bei RT kräftig gerührt. Die Nukleotide wurden durch Präzipitation mit Ethanol isoliert und dann in 300µl Wasser gelöst. Anschließend wurde 200µl TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zugegeben und nach 10 min bei RT erfolgt die wiederholte Präzipitation der 35 Nukleotide. Die Trennung der modifizierten Nukleotide von den nicht modifizierten ist auf dieser Stufe nicht notwendig. Ausbeute 13%, UV-Vis.
- Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

**Beispiel 14:**

TTP-3`-Amino-PDTP, Fig 24B

Die Synthese erfolgte wie für dUTP-AA, Beispiel 1, beschrieben: Als Edukte wurden

- 5 3`-Amino-3`-Deoxy-TTP, 100µl, 10mmol/l Lösung, pH 8 und PDTP-NHS eingesetzt.  
Ausbeute 19%, UV-Vis.

Das Produkt trägt eine Disulfidbindung, die leicht an einer Thiolaustauschreaktion teilnehmen kann und somit an andere Verbindungen gekoppelt werden kann.

- 10 Auch andere, am 3`-Ende mit einer Bindungsstelle, z.B. einem kurzen Linker, modifizierte Nukleotide können eingesetzt werden. Synthesen sind dargestellt beispielsweise in Metzker et al. Nucleic acid Research 1994, V.22, S. 4259, Canard et al. Gene, 1994, V. 148, 1, Hovinen et al. J. Chem. Soc. Perk. Trans. 1994V.1, S. 211, Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta, 1994, V. 77, S. 586, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363, Canard US. Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642.
- 15

- Weitere Beispiele für basenmodifizierte Nukleotide, die als Nuk-Komponente verwendet werden können, sind in Balasubramanian WO 03048387 beschrieben. Noch weitere Beispiele für Nukleotid-Analoga sind in "Nucleotide Analogs" Scheit, 1980, ISBN 0-471-04854-2, "Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry", Kisakürek 2000, "Anti-HIV Nucleosides" Mitsuya, 1997, "Nucleoside Analogs in cancer therapy", Cheson, 1997 angegeben. Ein Fachmann sollte erkennen, daß auch andere Nukleoside und Nukleotide verwendet werden können.
- 25

### **Beispiele für Kopplung von Linker-Komponenten und Marker-Komponenten an Nuk-Komponenten**

#### **Beispiel 15:**

- 30 dUTP-AA-SS-MEA-Cy3, Fig. 25  
Zu 100µl, 10mmol/l MEA-Cy3 In 50mM Borat, pH 9.5, wurde 50µl 30mmol/l dUTP-AA-PDTP in 50mM Borat, pH 9.5 zugegeben. Nach 1 Stunde wurde das dUTP-AA-SS-MEA-(Cy3) durch Dünnschicht-Chromatographie, LM 1, Rf. 0.6, von MEA-Cy3, Rf. 0.9, getrennt. Anschließend wurde dUTP-AA-SS-MEA-(Cy3) auf RP-18 von dUTP-AA-PDTP getrennt. Ausbeute 67%, UV-Vis.
- 35

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und eine niedermolekulare Marker-Funktionalität trägt.

Das Produkt ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular. Es kann stellvertretend für konventionell modifizierte Nukleotide mit nur einem niedermolekularen Marker auftreten.

- 5 Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase) als Substrat akzeptiert, s. Beispiel 34A.

**Beispiel 16:**

- 10 dUTP-AA-SS-TEAE-(Cy3)2, Fig. 26

dUTP-AA-SS-TEAE-(Cy3)2 wurde ähnlich wie dUTP-AA-SS-MEA-(Cy3), Beispiel 15, synthetisiert, dabei wurde TEAE-(Cy3)2-Propionat-SH anstatt von MEA-Cy3 verwendet. Ausbeuten 43%, UV-Vis.

- 15 Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und zwei niedermolekulare Marker-Funktionalitäten trägt.

Das Produkt ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular. Es kann stellvertretend für konventionell modifizierte Nukleotide mit mehreren niedermolekularen Markern auftreten.

- 20

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation des Nukleotids führt zum Verlust der Subrateigenschaften.

**Beispiel 17:**

- dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3, Fig. 27

dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3 wurde ähnlich wie dUTP-AA-SS-MEA-Cy3, Beispiel 15, synthetisiert, dabei wurde Cy3-TEAE-Propionat-SH anstatt von MEA-Cy3

- 30 verwendet. Ausbeute 37%, UV-Vis.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und eine niedermolekulare Marker-Funktionalität: Der Linker an der Base hat eine freie Aminogruppe, die modifiziert werden kann.

- 35 Das Produkt ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular. Das Nukleotid wird von Polymerasen als Substrat akzeptiert.

**Beispiel 18:****(dUTP-AA-SS-Propionat)m-Poly-Lysin-(Cy3)n**

Edukte:

- 5 dUTP-AA-PDTP  
 (HS-Propionat)m-Poly-Lysin-(Cy3)n, n = 10-15, m. 3-9, Poly-Lysin 10.000-20.000

Zu 50 $\mu$ l einer Lösung mit dUTP-AA-PDTP, 20mmol/l, in 50mM Borat-Puffer, pH 9.0, wurde 20 $\mu$ l (HS-Propionat)m-Poly-Lysin-(Cy3)n, ca. 1mmol/l, in Wasser, gegeben und 10 18 h bei RT gerührt. Das Produkt wurde durch Ultrafiltration, 30.000 MWCO, gereinigt.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten trägt. Das Produkt der Reaktion ist 15 definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist unter 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation des Nukleotids führt zum Verlust der Substrateigenschaften.

20

**Beispiel 19:****dUTP-AA-PEG-Biotin, Fig. 28**

Zu 100 $\mu$ l wässriger Lösung dUTP-AA, 50mmol/l, pH 8.0, wurden 10mg Biotin-PEG-NHS gegeben und bei 40°C 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das nicht umgesetzte 25 Nukleotid durch Ultrafiltration, 3.000 MWCO, abgetrennt und mehrmals mit Wasser gewaschen. Ausbeute 6%, UV-Vis.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker. Biotin dient als Kopplungseinheit T. An diese Kopplungseinheit T können 30 makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, z.B. Streptavidin, ohne daß die Subrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen. Dieses Nuk-Makromolekül dient als Substrat für Polymerasen.

Biotin kann auch als eine niedermolekulare Marker-Einheit mit signalvermittelnden Funktion betrachtet werden, die an den langen Linker gekoppelt ist.

35

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromoleküls: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome und an die Kopplungseinheit T können weitere Makromoleküle gekoppelt werden.

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Propargylamino-dCTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP (Fig. 29) können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl

- 5 Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukletide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

**Beispiel 20:**

TTP-3'-Amino-PEG-Biotin,

- 10 Die Synthese erfolgte ähnlich wie für dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19. Als Edukte wurden 3'-Amino-3'-Deoxy-TTP und Biotin-PEG-NHS eingesetzt. Ausbeute 4%, UV-Vis.

15 Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker und eine niedermolekulare Marker-Einheit (Biotin), die eine signalvermittelnde Funktion hat. An das Biotin können makromolekulare signaltragende Streptavidin-Moleküle gekoppelt werden.

- 20 Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular.

Auch andere Nukleotid-Analoga mit einer Amino-Gruppe in der 3'-Position können in ähnlicher Weise gekoppelt werden.

**Beispiel 21:**

dCTP-PA-PEG-Maleimid,

Die Synthese erfolgte wie für dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19, beschrieben. Als Edukte wurden dCTP-PA und Maleimid-PEG-NHS eingesetzt. Ausbeute 7%.

- 30 Diese Verbindung hat eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker. Kopplungseinheit T an diesem Linker ist die Maleimid-Gruppe. An Maleimid-Funktionalität können makromolekulare signaltragende Moleküle gekoppelt werden, die eine oder mehrere SH-Gruppen tragen.

- 35 Maleimid-Gruppe kann auch als eine niedermolekulare Marker-Einheit mit signalvermittelnden Funktion betrachtet werden, die an den langen Linker gekoppelt ist.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromoleküls: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist niedermolekular. An diese Marker-Komponente können makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, ohne daß die Subrateigenschaften

5 dieser Analoga verloren gehen.

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Allylamino-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie 10 oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukletide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

#### **Beispiel 22:**

15 dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-(Cy3)-PEG-Biotin, Fig. 30

Die Synthese erfolgte wie für dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19 beschrieben. Als Edukte wurden dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3 und Biotin-PEG-NHS eingesetzt., Ausbeute 5%. Die Trennung vom nicht abreagierten dUTP-Analog erfolgte durch Ultrafiltration, 3.000 MWCO.

20

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität, einen Farbstoff, einen makromolekularen Linker und eine niedermolekulare Marker-Funktionalität (Biotin), die eine signalvermittelnde Funktion hat. Biotin kann auch als eine Kopplungseinheit T des Linkers betrachtet werden.

25 Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromoleküls: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, Biotin dient als Kopplungseinheit T. An diese Kopplungseinheit T können makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, ohne daß die Subrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen.

30 Dieses Nuk-Makromolekül dient als Substrat für Polymerasen.

Der Farbstoff dient als sterisch anspruchsvolle Gruppe, die den enzymatischen Einbau von nur einem Nuk-Makromolekül in den wachsenden Strang durch die Polymrase zuläßt. Die Eigenschaften solcher Nukleotide sind detailliert in Tcherkassov WO

35 02088382 beschrieben.

**Beispiel 23:**

dUTP-AA-SS-PEG-Biotin, Fig. 31,

Zu 100 $\mu$ l, 10mmol/l Biotin-PEG-Ethyl-SH in 50mM Borat, pH 9.5, wurde 50 $\mu$ l

30mmol/l dUTP-AA-PDTP in 50mM Borat, pH 9.5 zugegeben. Reaktion wurde 18

- 5 Stunden bei RT gerührt. Die Trennung erfolgt wie für die Synthese von dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19 beschrieben.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen

Linker. Biotin dient als Kopplungseinheit T. An diese Kopplungseinheit T können

- 10 makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, z.B. Streptavidin, ohne daß die Substrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen. Dieses Nuk-Makromolekül dient als Substrat für Polymerasen. Über Streptavidin können auch weitere makromoleküle, beispielsweise Enzyme oder Nukleinsäurengre koppelt werden.

- 15 Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome.

Biotin kann auch als signalvermittelnde niedermolekulare Marker-Einheit bezeichnet werden.

- 20 Die Linker-Komponente kann zusammen mit der Marker-Komponente von der Nuk-Komponente unter milden Bedingungen abgespalten werden. Dies kann beispielsweise von Vorteil sein, wenn eine Sequenzierung durch Synthese (Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382) durchgeführt wird, wobei nach jedem Detektionsschritt eine Entfernung der Marker notwendig ist.

- 30 Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Propargylamino-dCTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukletide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

**Beispiel 24:**

- 35 TTP-O-Propionat-SS-PEG-Biotin,

Zur 100 $\mu$ l Lösung von TTP-O-Propionat-SH, 10mmol/l, in 50mM Borat-Puffer, pH 9.5, wurden 100 $\mu$ l einer Lösung von Bis-Dithio-(Ethyl-PEG-Biotin), 0.5mmol/l, in Wasser

gegeben und 24 Stunden bei RT gerührt. Die Aufreinigung erfolgte durch Ultrafiltration mit 3.000 MWCO.

Beispiele für die Kopplung von Aminogruppen an die Phosphatreste der Nukleotide sind in

- 5 D. Jameson et al. Methods in Enzymology 1997, V. 278, 363 angegeben. An diese Amino-Gruppe kann eine Linker-Komponente gekoppelt werden.

### **Kopplungen an Marker-Komponenten**

#### **Beispiel 25, :**

- 10 (dUTP-16-Biotin)4-SA,

Zu 200µl einer Lösung von Biotin-16-dUTP 200µmol/l in 50mM Tris-HCl, pH 8.0, wurden 200µl einer Streptavidin-Lösung, 1mg/ml, in 50mM Tris-HCl, pH 8.0, zugegeben. Nach 1 Stunde bei RT wurde das (dUTP-16-Biotin)4-SA vom nicht umgesetzten Biotin-16-dUTP durch Ultrafiltration, 50.000 MWCO, abgetrennt.

15

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten trägt.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente ist

- 20 makromolekular. Es kann stellvertretend für konventionell modifizierte Nukleotide mit einem makromolekularen Markern betrachtet werden.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation führt zum Verlust der Substrateigenschaften, s. Beispiel 34B.

Eigenschaften der Biotin-Streptavidin-Bindung sind z.B. in Gonzalez et al. Journal Biolog. Chem. 1997, v. 272, S. 11288 beschrieben.

#### **Beispiel 26:**

- 30 (dUTP-16-Biotin)4-SA-Cy2,

Die Kopplung von dUTP-16-Biotin an SA-Cy2 wurde wie für (dUTP-16-Biotin)4-SA beschrieben durchgeführt.

Die Verbindung dient als Äquivalent zu Verbindung aus Beispiel 25, wobei zur Visualisierung Streptavidin fluoreszent markiert ist.

35

**Beispiel 27:**

dCTP-PA-SS-Oligo-dT30,

Die Synthese erfolgte wie bei dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 beschrieben. Zu dCTP-PA-PDTP, 100µl, 20mmol/l, wurde Oligo-dT30-3'-SH (MWG-Biotech) zugegeben,

- 5 Endkonzentration 200µmol/l und 18 Std bei RT, pH 9, gerührt. Die Aufreinigung erfolgte durch Ultrafiltration mit 3.000 MWCO.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein konventionell modifiziertes Nukleotid-Analog: die Linker-Länge ist kleiner als 30 Atome, die Marker-Komponente  
10 ist makromolekular.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation des Nukleotidteils führt zu Aufhebung der Substrateigenschaften.

**Beispiel 28:**

(dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Cy2 und (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA, Fig. 32

Die Kopplung von dUTP-AA-PEG-Biotin an SA-Cy2 bzw. an SA wurde wie für (dUTP-16-Biotin)4-SA beschrieben durchgeführt. Zu 200µl 1µg/µl Streptavidin wurden 10µl einer Lösung von dUTP-AA-PEG-Biotin, ca. 1mmol/l, gegeben, und bei RT 1 h gerührt.

- 20 Danach wurde das Produkt durch Ultrafiltration, 50.000 MWCO, von dem nicht gekoppelten dUTP-AA-PEG-Biotin abgetrennt und das Produkt 2 mal mit Wasser gewaschen.

Ein Teil des gewonnenen (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Cy2 wurde mit Cy3-NHS modifiziert: 50µl (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Cy2 wurden in 50mmol/l Borat, pH 8.5, aufgelöst, bis zur Konzentration von 1.4µg/µl, und anschließend mit Cy3-NHS versetzt. Endkonzentration von Cy3 betrug 10mmol/l. Die Reaktion wurde 1 Std. bei RT durchgeführt. Das Produkt, (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Cy2/Cy3, wurde durch Ultrafiltration mit 30.000 MWCO getrennt.

- 30 Dadurch wurde ein Nuk-Makromolekül hergestellt, dass sehr wenige freie Amino-Gruppen am Marker-Teil aufweist.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente trägt.

- 35 Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular. Es kann stellvertretend für Nuk-Makromoleküle betrachtet werden.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert s. Beispiel 34,35.

- Auch andere Verbindungen, die einen langen Linker haben und ein Biotin-Molekül  
 5 tragen, s. Beispiele 20, 22, 23, 24, können ähnlich in der Synthese eingesetzt werden.

**Beispiel 29:**

(dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Alkalische Phosphatase, Fig.33, und (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-QDot, Fig. 34,

- 10 Die Kopplung von dUTP-AA-PEG-Biotin an SA-AP bzw. QDot wurde wie für (dUTP-16-Biotin)4-SA beschrieben durchgeführt.

Im Falle von QDot werden Nuk-Linker-Teile an der Oberfläche der QDots angeordnet.

- 15 Es wurden Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente mit einem Enzym bzw. Q-Dots trägt.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

- 20 Auch andere Verbindungen, die einen langen Linker haben und ein Biotin-Molekül tragen, s. Beispiele 20, 22, 23, 24, können ähnlich in der Synthese eingesetzt werden.

**Beispiel 30:**

(dUTP-AA-PEG-Biotin)2-(dT31-TEG-Biotin)2- SA-Cy2, , Fig: 35A

Die Kopplung von dUTP-AA-PEG-Biotin an SA-Cy2 wurde wie für (dUTP-16-Biotin)4-SA beschrieben durchgeführt:

Zu 100µl einer Streptavidin-Cy2-Lösung, 20µmol/l (1.2mg/ml), in Tris-HCl, 50mmol/l, pH 8, wurden 80µl 80µmol/l dT31-3`-TEG-Biotin (MWG Biotech) zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. (TEG ist ein kurzer Linker zwischen Biotin und dT31). Danach

- 30 wurden 100µl einer Lösung dUTP-AA-PEG-Biotin 50µmol/l in 50mM Tris-HCl, pH 8.0, zugegeben. Nach 10 min bei RT wurde (dUTP-AA-PEG-Biotin)2-(dT31-TEG-Biotin)2-SA-Cy2 durch Ultrafiltration, 50.000 MWCO, gereinigt.

Die Substanz trägt eine Nukleosid-Triphosphat-Funktionalität und eine

- 35 makromolekulare Marker-Funktionalitäten (Oligo-dT31). Das Oligo-dT31 besteht aus Nukleosidmonophosphaten, die allerdings an der enzymatischen Reaktion nicht teilnehmen und nur eine signalvermittelnde Funktion haben. An ein solches Oligonukleotid können komplementäre Nukleinsäuren hybridisiert werden, die eine

signalgebende Funktion haben (Fig. 35B). (allgemeine Regeln zur Hybridisierung von Nukleinsäuren sind dem Fachmann bekannt, Anderson "Nucleic Acid Hybridization", 1999).

- 5 Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular. Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.
- 10 Dieses Derivat kann beispielsweise an Poly-dA oder poly-A (z.B. mit durchschnittlicher Länge 260NT, Amersham Bioscience) durch Hybridisierung gekoppelt werden. Sowohl ein einziges als auch mehrere (dUTP-AA-PEG-Biotin)2-(dT31-Biotin)2- SA-Cy2 Moleküle können an ein Poly-dA-Molekül gekoppelt werden, s.auch Fig. 5. Das Verhältnis wird durch die Konzentrationsverhältnisse bestimmt. Auch andere Oligonukleotide, beispielsweise markiert mit Farbstoffen, können zusammen mit(dUTP-AA-PEG-Biotin)2-(dT31-Biotin)2- SA-Cy2 an denselben Strang der Poly-dA oder poly-A gekoppelt werden, wobei die Verhältnisse zwischen einzelnen Molekülen variabel sind. Dadurch ist es möglich, ein polyfunktionales Nuk-Makromolekül herzustellen. Der große Vorteil eines solchen Nuk-Makromoleküls besteht in einer 20 leicht spaltbaren makromolekularen Markierung: die an die poly-dA bzw. poly-A Strände hybridisierten markierten Oligonukleotide können durch Denaturierung abgelöst werden. Durch die Wahl der Länge der markierten Oligonukleotide, kann die Tm dieser Oligonukleotide für die jeweiligen Anforderungen der reversiblen Markierung angepasst werden. Die Regeln zur Tm-Berechnung sind dem Fachmann bekannt 25 ("Molecular-Cloning", J. Sambrook, band 1-3, 2001). Beispielsweise können dT<sub>25</sub>-Oligonukleotide, markiert mit einem Cy3-Molekül an Poly-dA gekoppelt werden. Durch den Einsatz von RNA, z.B. poly-A, zur Bindung mehrerer (dUTP-AA-PEG-Biotin)2-(dT31-Biotin)2-SA Moleküle, kann die Spaltung durch eine RNase erfolgen.
- 30 Da Streptavidin 4 Bindungsstellen für Biotin hat, entsteht ein Gemisch von Nuk-Makromolekülen, bei dem 4 Bindungsstellen unterschiedlich besetzt sind. Dieses Gemisch kann mit unterschiedlichen Mitteln getrennt werden. Eine der Möglichkeit besteht in Isolierung von Nuk-Makromolekülen, die mindestens ein Oligo-dT31 tragen, beispielsweise durch eine Absorbtion an einem Anionenaustauscher (z.B. einer DEAE-Cellulose-Säule). Aufgrund eines großen Ladungsunterschieds zwischen den mit 35 Oligonukleotiden markierten und nicht markierten Streptavidin-Molekülen, lassen sich die Produkte leicht trennen.

Auch längere Nukleinsäureketten, die ein Biotin-Molekül tragen, beispielsweise poly-dA-Biotin, hergestellt beispielsweise durch eine terminale Kopplung von ddUTP-18-Biotin durch eine TdT-abhängige Reaktion ("Molecular-Cloning", J. Sambrook, Band 1-3, 2001), können in ähnlicher Weise an das Streptavidin gekoppelt werden, so dass

- 5 Moleküle mit einer durchschnittlichen Zusammensetzung von  $(dUTP-AA-PEG-Biotin)_N \cdot (Nukleinsäureketten-Biotin)_M \cdot SA$  entstehen. Sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Nukleinsäureketten können gekoppelt werden. Die Länge der gekoppelten Nukleinsäureketten kann zwischen 10 und 100, 100 und 1000 Nukleotiden liegen.

10

Die hybridisierten Oligonukleotide, die einen Farbstoff tragen, können an den Poly-dA Strang auch kovalent durch Cross-Linker gebunden werden.

15

Auch andere Verbindungen, die einen langen Linker haben und ein Biotin-Molekül tragen, s. Beispiele 20, 22, 23, 24, können ähnlich in der Synthese eingesetzt werden.

**Beispiel 31:**

$(dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4 \cdot SA$  und  $(dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4 \cdot SA-Cy2$ , Fig. 36

Die Kopplung von dUTP-AA-SS-PEG-Biotin an SA bzw. an SA-Cy2 wurde wie für

- 20  $(dUTP-AA-PEG-Biotin)4 \cdot SA$  beschrieben durchgeführt. Als Edukte wurden Streptavidin und dUTP-AA-SS-PEG-Biotin eingesetzt.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente trägt. Die Linker-Komponente und die Marker-Komponente können von der Nuk-Komponente unter milden Bedingungen abgespalten werden.

Das Produkt der Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular.

- 30 Es kann stellvertretend für Nuk-Makromoleküle betrachtet werden, die eine unter milden Bedingungen spaltbare Verbindung in der Linker-Komponente tragen.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert s. Beispiel 34.

35

**Beispiel 32:**

dCTP-PA-PEG-Maleimid-S-Oligo-dT30, Fig. 37A

Zu 100 $\mu$ l einer Lösung mit dCTP-PA-PEG-Maleimid, 5mmol/l, in 50mM Borat-Puffer, pH 9.5, wurde 100 $\mu$ l einer Lösung von 3'-SH-Oligo-dT30, 200 $\mu$ mol/l, in Wasser zugegeben und 48 Std. bei RT gerührt. Das Produkt wurde mittels präparativer Gel-Elektrophorese, 12% Polyacrylamid-Gel, gereinigt. Ausbeute 14%.

- 5 Die Substanz trägt eine Nukleosid-Triphosphat-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten (Oligo-dT30). Das Oligo-dT30 besteht aus Nukleotiden, die allerdings an der enzymatischen Reaktion nicht teilnehmen und nur eine signalvermittelnde Funktion haben. An ein solches Oligonukleotid können  
10 komplementäre Nukleinsäuren hybridisiert werden, die eine signalgebende Funktion haben (Fig. 37B). (allgemeine Regeln zur Hybridisierung von Nukleinsäuren sind dem Fachmann bekannt, Anderson "Nucleic Acid Hybridization", 1999.)

- 15 Das Nukleotid ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge ist deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular.  
Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

- 20 Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Allylamino-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukletide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

- 25 Durch Zugabe von Poly-dA oder Poly-A können mehrere dCTP-PA-PEG-Maleimid-S-Oligo-dT30, z.B. 10-20, zu einem Nuk-Makromolekül gekoppelt werden. Dabei entsteht ein Nuk-Makromolekül mit linear angeordneten Nuk-Linker-Komponenten (Fig. 37 C).

- 30 **Beispiel 33 :**  
(dCTP-PA-PEG-Maleimid-S)n-Poly-Lysin-(Cy3)m,  
Edukte: dCTP-PA-PEG-Maleimid  
(HS-Propionat)m-Poly-Lysin-(Cy3)n, n = 10-15, m 3-9, Poly-Lysin 10.000-20.000  
35 Zu 100 $\mu$ l einer Lösung mit dCTP-PA-PEG-Maleimid, 5mmol/l, in 50mM Borat-Puffer, pH 9.5, wurde 20 $\mu$ l einer Lösung von (HS-Propionat)m-Poly-Lysin-(Cy3)n, ca. 1mmol/l, in Wasser, gegeben und 18 Std. bei 40°C gerührt. Das Produkt wurde durch Ultrafiltration, 30.000 MWCO, gereinigt.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente trägt. Pro Nuk-Makromolekül sind mehrere Nuk-Komponenten gekoppelt. Das Produkt der

- 5 Reaktion ist definitionsgemäß ein Nuk-Makromolekül: die Linker-Länge deutlich größer als 30 Atome, die Marker-Komponente ist makromolekular.
- Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo- Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.
- 10 Weitere Kombinationen von Nuk-Komponenten, Linker-Komponenten und Marker-Komponenten sind dem Fachmann naheliegend.

#### **Vergleich von Substrateigenschaften einiger Vertreter von Nuk-Makromolekülen mit konventionell modifizierten Nukleotiden.**

15

- Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle gegenüber Polymerasen und Terminale deoxy-Nucleotidyl-Transferase (TdT) wurden mit den Eigenschaften der konventionell modifizierten Nukleotide in einer Markierungsreaktion verglichen. Allgemeine Prinzipien von Markierungsreaktionen findet man in "Molecular-Cloning", J. Sambrook,
- 20 Band 1-3, 2001, ISBN 0-87969-576-5.

#### **Beispiel 34: Substrateigenschaften von Nuk-Makromolekülen oder konventionell modifizierten Nukleotiden gegenüber Polymerasen**

25

- Dieses Beispiel soll nicht zur Einschränkung der möglichen Markierungsreaktionen dienen, sondern lediglich Unterschiede in den Substrateigenschaften verdeutlichen.

- In den Reaktionen wurden sowohl selbst synthetisierte als auch kommerziell erhältliche modifizierte Nukleotide dUTP-Cy3 (Amersham) und dUTP-16-Biotin (Roche)

30 verwendet. Nicht modifizierte dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) wurden bei der Firma Roth erworben.

Als Matrizen dienten sowohl kurze Oligonukleotide als auch poly-dA. Primer und Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech synthetisiert.

35

Reaktionen wurden in 20mmol/l Tris-Puffer, pH 8.5, 5mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerin, durchgeführt. Die Konzentrationen der Primer betrugen 1µmol/l, die der Oligonukleotide 1µmol/l und die Konzentration der poly-dA, 0.1µg/µl (für die

Konzentrationsverhältnisse an der festen Phase s.u.). Als Polymerase wurde Klenow exo- 1Unit /100µl (Amersham) verwendet. Die Konzentrationen von Nukleotiden betragen 20µmol/l für konventionell modifizierte Nukleotide und 5 µmol/l für Nuk-Makromoleküle. Nicht modifizierte Nukleotide wurden in Konzentrationen von 50µmol/l eingesetzt.

Zunächst wurden Primer an die jeweilige Matrize hybridisiert: Das Reaktionsgemisch ohne Polymerase wurde auf 75°C erhitzt und über 5 min auf 37°C abgekühlt. Danach wurde die Polymerase zugegeben. Alle Reaktionen wurden über 1 h bei 37°C

durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration von 10mmol/l) gestoppt.

Zu einigen Ansätzen wurde nach dem Stop der Reaktion Streptavidin, bis zu Endkonzentration von 1mg/ml, zugegeben und der Ansatz weitere 10 min bei 37°C Inkubiert. Dadurch können bereits eingebaute Nukleotide, die ein Biotin tragen, mit Streptavidin reagieren und somit Streptavidin und Oligonukleotid verbinden. Diese Experimente eignen sich als Kontrolle für die Laufeigenschaften von modifizierten Primern.

Zu entsprechend gekennzeichneten Ansätzen wurde Mercaptoethanol (bis 20mmol/l Endkonzentration) zugegeben und der jeweilige Ansatz wurde 10 min bei 37°C Inkubiert. Mercaptoethanol wurde bei einigen Anstzen während, bei anderen Ansätzen auch nach der Reaktion zugegeben.

Die Analyse der Reaktion erfolgte mittels denaturierender Gel-Elektrophorese, 20% Polyacrylamid-Gel, 50mmol/l Tris-HCl, pH 8.7, wie in "Gel electrophoresis of nucleic Acids", Ed. D. Rickwood, 1990, dargestellt. Zur Denaturierung der Proben wurde anstatt von 7M Urea eine erhöhte Temperatur bei der Gelelektrophorese eingesetzt (60°C). Die Elektrophorese wurde in Biorad-Gelkammern (Protean 3) durchgeführt, 200V, ca. 1h. Die Visualisierung erfolgte auf einer UV-Vis Gel-Dokumentationsanlage (Biorad).

**Beispiel 34A, Fig. 38**

**Darstellung des Einbaus und Spaltung von einem konventionell modifizierten Nukleotid (dUTP-AA-SS-MEA-Cy3)**

**5 Sequenzen:**

Primer:

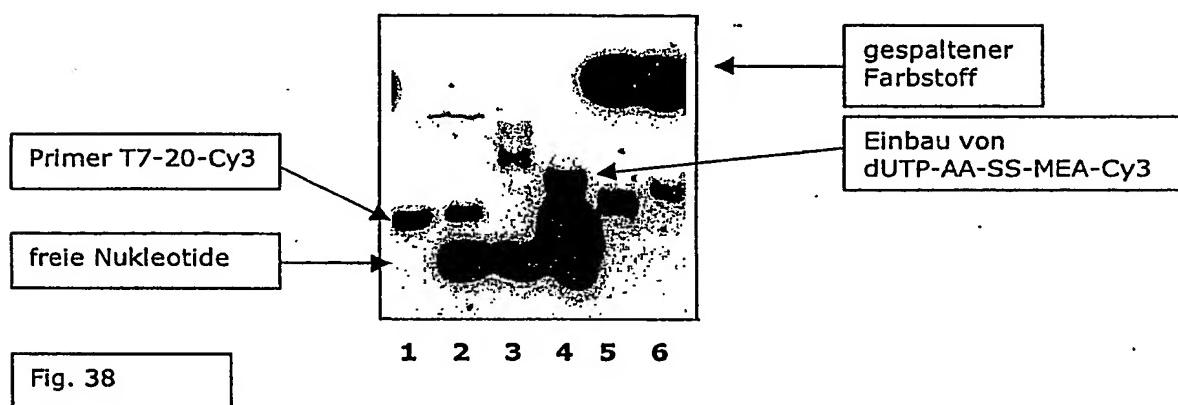
Primer-T7-20-5'-Cy3: 5' - Cy3-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Matrize:

Oligonukleotid

10 Oligo 1: 5`-AGTTTTAGTTTACCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3`

Die Primer-Bindungsstelle ist unterstrichen

**Legende:**

Spuren 1-6:

1) nur PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1

2) PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1+ dCTP-Cy3 + dATP + dGTP+ Polymerase

3) PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1+ dCTP-Cy3 + dATP + dGTP + dTTP+ Polymerase

4) PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1+ dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 + Polymerase

5) nach 1 Std. wurde zu einem Aliquot von Ansatz 4 Mercaptoethanol zugegeben und

20 weitere 10 min inkubiert, es erfolgt eine Abspaltung der Markierung

6) nach 10 min wurde zum Aliquot von Ansatz 5 dATP, dGTP zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert

Wie man sieht, wird dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 von der Polymerase eingebaut (Spur 4).

25 Der Farbstoff kann vom Primer abgespalten werden (Spur 5) (man sieht eine Verschiebung der Bande, die durch die geringere Größe von Oigonukleotid zu begründen ist). Anschließend können weitere Nukleotide eingebaut werden (Spur 6).

Ein ähnlich durchgeföhrter Reaktionsansatz mit dUTP-AA-SS-TEAE-(Cy3)2 führte nicht zum Einbau des Nukleotid-Analogs in den Primer.

Dieses Beispiel zeigt, daß sogar geringfügige Veränderungen in der Analog-Struktur,

- 5 wie z.B. Verdopplung der Zahl der Farbstoffe, die an ein Nukleotid gekoppelt sind, zu Veränderung in Substrateigenschaften der Nukleotide führen können.

**Beispiel 34B, Fig. 39**

**Vergleich von Substrateigenschaften eines konventionell modifizierten**

- 10 **Nukleotid mit einem makromolekularen Marker und einem Nuk-Makromoleköl**

**Sequenzen:**

Primer:

Primer-dT<sub>35</sub>-5'-Cy3 (dT35-Cy3): 5' Cy3-TTT-3'

15 Matrize:

Poly-dA (Amersham), durchschnittlich 270 Nukleotide lang.

Nukleotide: (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA, (dUTP-16-Biotin)4-SA, dUTP-16-Biotin

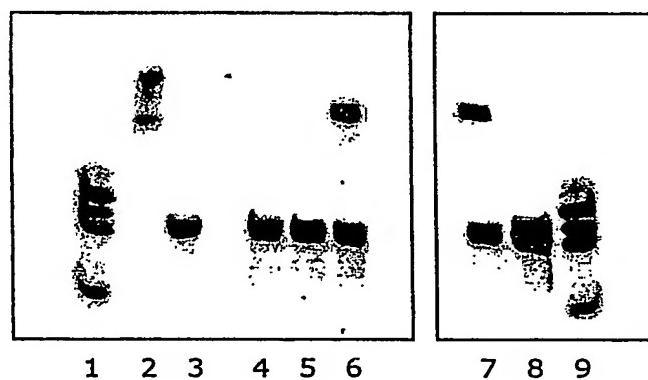


Fig. 39

**Legende:**

- 20 Spuren 1-9:

- 1) Leiter: T-7-20-Cy3, dT35-Cy3, dT40-Cy3, dT50-Cy3
- 2) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA + Polymerase
- 3) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA
- 4) (dUTP-16-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA + Polymerase
- 25 5) (dUTP-16-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA
- 6) (dUTP-16-Biotin)4-SA-Cy3 + dT35-Cy3 + Poly-dA

Im Kontroll-Ansatz, Spuren 7-9:

- 7) dUTP-16-Biotin + dT35-Cy3 + Poly-dA + Polymerase, Inkubation 1 std. 37°C  
 danach + EDTA bis 10mmol/l Endkonzentration, danach + Streptavidin 10 min 37°C  
 8) dUTP-16-Biotin + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase, Inkubation 1 std. 37°C  
 danach + EDTA bis 10mmol/l Endkonzentration,

5 9) Leiter: T-7-20-Cy3, dT35-Cy3, dT40-Cy3, dT50-Cy3

Ein Nuk-Makromolekül, (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA, wird in den Primer eingebaut (Spur 2). Der markierte Primer hat nach dem Einbau eines Nuk-Makromoleküls eine stark veränderte elektrophoretische Beweglichkeit. Bloße Anwesenheit von Nuk-

10 Makromolekülen hat keinen Einfluß auf den Primer (Spur 3).

Ein konventionell modifiziertes Nukleotid, (dUTP-16-Biotin)4-SA, mit einem makromolekularen Marker wird nicht in den Primer eingebaut (Spur 4). Trotz der Anwesenheit der Polymerase in Reaktion 4 (Spur 4) lassen sich keine Unterschiede zwischen Spur 4 und Spur 5 feststellen.

Spur 6 zeigt die Position des konventionell modifizierten Nukleotids mit einem makromolekularen Marker, (dUTP-16-Biotin)4-SA-Cy3, die obere Bande, und die Position des markierten Primers (die untere Bande).

20 Spur 7 zeigt das Ergebnis des Einbaus von dUTP-16-Biotin mit einer nachfolgenden Reaktion mit dem Streptavidin: die mit Biotin markierten Primer reagieren mit Streptavidin und verändern ihre Laufeigenschaften. Die nicht modifizierten Primer behalten ihre elektrophoretischen Eigenschaften bei.

25 Spur 8 zeigt das Ergebnis der Einbaureaktion eines konventionell modifizierten Nukleotides, dUTP-16-Biotin. Man sieht eine verbreitete Primer-Bande, die durch den Einbau von dUTP-16-Biotin in den Primer zustande kommt. Die Verlängerung von Primer ist eingeschränkt, da dUTP-16-Biotin nicht unbegrenzt nacheinander eingebaut werden kann, durchschnittlich wird ca. 3 dUTP-Analoga eingebaut, so daß die Länge von Primer durchschnittlich auf 38 NT ansteigt. Erwartungsgemäß führt der Einbau von konventionell modifizierten Nukleotiden mit einem niedermolekularen Marker nicht zu einer starken Veränderung in der elektrophoretischen Mobilität der Primer.

35 In diesem Experiment wurden Eigenschaften der Nuk-Makromoleküle, (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA, mit denen der Konventionell modifizierten Nukleotide verglichen. Man sieht deutlich, daß die Kopplung eines makromolekularen Markers an ein kommerziell erworbenen dUTP-16-Biotin zum vollständigen Verlust der

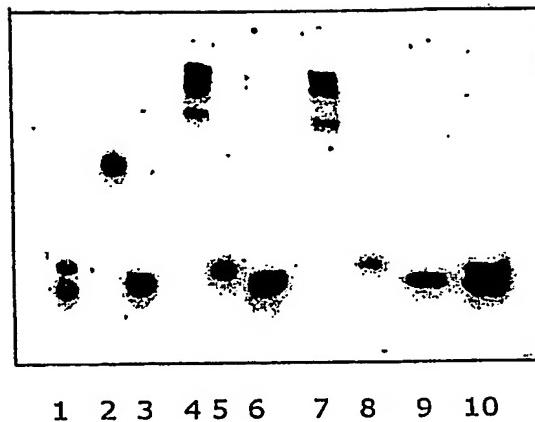
Subrateigenschaften der Nukleotide führt. Spuren 7 und 8 zeigen allerdings, daß die Polymerase sehr wohl in der Lage ist, dUTP-16-Biotin ohne makromolekularen Marker in den Primer einzubauen. Die Koppung von Streptavidin an das Biotin nach der Einbaureaktion führt zu genannten Veränderungen in Primer-Eigenaschaften.

- 5 Im Gegensatz dazu können Nuk-Makromoleküle (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA in den Primer ohne Schwierigkeiten durch die Polymerasen eingebaut werden. Das Auftreten von mehreren Banden im Gel führen die Erfinder auf einen mehrfachen Einbau von Nuk-Makromolekülen in den Primer (3 Banden) zurück.

- 10 **Beispiel 34C, Fig. 40:**  
**Vergleich von Subrateigenschaften von Nuk-Makromolekülen, Einbau-Reaktion in der Lösung und an einer festen Phase**

- 15 **Sequenzen:**  
 Primer: (dT35-Cy3)  
 Primer-dT-35-5'-Cy3: 5` Cy3-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'  
 Matrize:  
 Poly-dA (Amersham), durchschnittlich 270 Nukleotide lang.  
 20 Oligo-dA50-3`-TEG-Biotin (MWG-Biotech)  
 Nukleotide: (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA, (dU-AA-PEG-Biotin)4-SA  
 Streptavidin-polystyrene Particle, 2.17 $\mu$ , Spherotech Inc,

- 25 **Vorbereitung von Streptavidin-polystyrene Particle (feste Phase).**  
 Drei Ansätze wurden in gleicher Weise vorbereitet.  
 Je 0.5 ml der Lösung mit Kügelchen (im Hersteller-Puffer) wurde kurz zentrifugiert und Kügelchen-Pellet wurde in 100 $\mu$ l Einbaupuffer (20 mmol/l Tris, pH 8.5, 5mmol/l MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Anschließend wurden 100 $\mu$ l Oligo-dA50-3`-TEG-Biotin Konz. 50 $\mu$ mol/l zugegeben und 1 h bei RT gerührt. In dieser Zeit binden die Oligo-dA-  
 30 Moleküle an die Kügelchen. Anschließend wurden Kügelchen kurz abzentrifugiert und drei mal im Einbaupuffer gewaschen. Endvolumen der festen Phase betrug je 100 $\mu$ l. Diese Menge an Oligo-dA50-feste-Phase kann Primer-dT-35-Cy3 in 2 $\mu$ mol/l hybridisieren.  
 Die Hybridisierung von Primer-dT-35-Cy3 erfolgte bei 40°C 10 min, mit anschließender  
 35 Abkühlung auf RT innerhalb von 10 min. Alle anderen Schritte wurden gleich bei allen Ansätzen durchgeführt.

**Legende:**

Spuren 1-10:

1) Leiter: dT35-Cy3, dT40-Cy3,

**5 Reaktionen in der Flüssigphase:**

2) (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase

3) (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA

4) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase, Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA

10 5) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase, Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA, anschließend + Mercaptoethanol bis zu 200mmol/l (Endkonzentration), für 30 min.

6) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA + EDTA

**Reaktionen an der Festphase:**

15 7) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Oligo-dA50-feste-Phase+ Polymerase, Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA

8) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Oligo-dA50-feste-Phase + Polymerase, Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA, anschließend + Mercaptoethanol bis zu 200mmol/l (Endkonzentration), für 30 min.

20 9) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Oligo-dA50-feste-Phase, vor Elektrophorese + EDTA

10) Leiter: dT35-Cy3, dT40-Cy3,

Man sieht deutlich das Ergebnis der Einbaureaktion von Nuk-Makromolekülen in Spuren 2,4,5,7,8. Sowohl in der Lösung, als auch an der festen Phase läuft die enzymatische Markierungsreaktion gut ab.

- Nach Zugabe von Mercaptoethanol zu mit EDTA gestoppten Reaktionen erfolgt die Abspaltung von Linker-Komponenten mit dem gebundenen Streptavidin von den Primern. Dies führt zu Wiederherstellung der elektrophoretischen Eigenschaften der Primer. Die Verschiebung der Primer-banden in Spuren 5 und 8 ist durch multiplen Einbau von Nuk-Makromolekülen in die Primer zu begründen. Tatsächlich, liegen die Primer-Banden nach der Spaltung in Höhe von dT40-Cy3 (s. Leiter). Dies bedeutet, daß bis zu 5 Nuk-Makromolekülen während der Reaktion in die Primer eingebaut wurden.

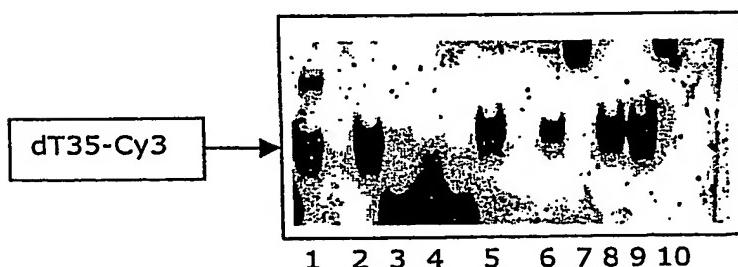
**Beispiel 35, Fig. 41:**

**Substrateingenschaften der Nuk-Makromoleküle und konventionell**

**modifizierter Nukleotide gegenüber Terminaler Transferase (TdT).**

Die Reaktion wurde nach Angaben des Kit-Herstellers (Roche) durchgeführt: Auf jeweils 50µl Volumen wurden zugegeben: 10µl 5x Reaktionspuffer, 1µl TdT (25Units), 5µl 25mmol/l CoCl<sub>2</sub>. Die Primer- und Nukleotid-Konzentrationen waren wie bei den Polymerase-Reaktionen. Die Reaktion wurde für 2 h bei 37°C durchgeführt.

Primer: Primer-dT<sub>35</sub>-5'-Cy3 (dT35-Cy3), Primer-dT<sub>35</sub> (dT35)



Legende:

- 1) (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + TdT  
 2) (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3  
 3) dUTP-Cy3 (Amersham)+ dT35 + TdT

- 4) dUTP-Cy3 (Amersham)+ dT35
  - 5) dUTP-16-Biotin (Roche) + dT35-Cy3 + TdT;
  - 6) Ansatz 5; nach dem Stop + Streptavidin
  - 7) Streptavidin -Cy2
- 5    8) (dUTP-16-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + TdT
- 9) (dUTP-16-Biotin)4-SA + dT35-Cy3
- 10) (dUTP-16-Biotin)4-SA-Cy2

In der Spur 1 sieht man deutlich 2 Banden, die Bande in der Mitte entspricht dem  
10 dT35-Cy3, die obere Bande entspricht dem Reaktionsprodukt: Nuk-Makromolekül  
wurde in dT35 durch TdT eingebaut. Spur 2 dient als Negativkontrolle. In Spur 3 sieht  
man das Ergebnis der Markierung des dT35 mit dem konventionellen Nukleotid dUTP-  
Cy3, Spur 4 ist die Nagativkontrolle. In Spur 5 ist das Ergebnis der Kopplung von  
15 dUTP-16-Biotin an die dT35-Cy3 schlecht zu erkennen. In Spur 6 sieht man allerdings  
eine schache Bande im oberen Bereich, die dem Ergebnis der Reaktion des mit dUTP-  
16-Biotin modifizierten Primers mit Streptavidin entspricht. Spur 7 zeigt die Position  
des modifizierten Streptavidins. In Spur 8 und 9 sieht man nur eine Bande in der Mitte  
20 des Gels, die dem dT35-Cy3 entspricht, im oberen Gel-bereich ist keine Bande zu  
sehen, was eindeutig darauf deutet, daß konventionell modifizierten Nukleotide mit  
einem makromolekularen Marker von TdT nicht eingebaut werden. Spur 10 zeigt die  
Position des (dUTP-16-Biotin)4-SA-Cy2 im Gel.

**Patentansprüche:****1. Makromolekulare Verbindungen mit der Struktur:**(Nuk-Linker)<sub>n</sub>-Marker

5 wobei:

Nuk - ein Nukleotid oder ein Nukleosid ist (Nuk-Komponente)

Linker - eine Linker-Komponente, die folgende Bestandteile einschließt:

a) Kopplungseinheit L - ein Teil des Linkers, das die Verbindung zwischen Nuk und dem Linkerrest darstellt

10 b) ein Polymer - ein Teil des Linkers, das ein wasserlösliches Polymer mit einer durchschnittlichen Länge zwischen 100 und 20.000 Atome ist

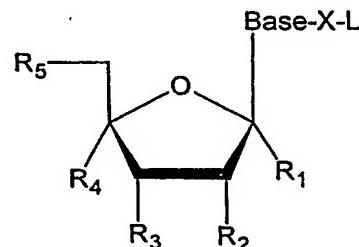
c) Kopplungseinheit T - ein Teil des Linkers, das die Verbindung zwischen dem Linkerrest und dem Marker darstellt

15 Marker - eine Marker-Komponente ist

n - eine ganze Zahl zwischen 1 und 100 ist

## 2. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt:

20



Wobei:

25 Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren Modifikationen , wobei X die Kopplungsstelle des Linkers an der Base ist und L - die Verbindung zwischen Nuk und Linker

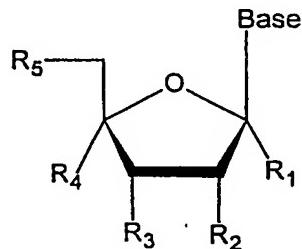
R<sub>1</sub> - ist H30 R<sub>2</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Halogen, NH<sub>2</sub>, SH oder geschützte OH-GruppeR<sub>3</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, PO<sub>3</sub>, SH, NH<sub>2</sub>, O- R<sub>3-1</sub>,

$P(O)_m$ -  $R_{3-1}$ ,  $NH-R_{3-1}$ ,  $S-R_{3-1}$ ,  $Si-R_{3-1}$  wobei  $R_{3-1}$  eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist und  $m$  gleich 1 oder 2 ist.

5  $R_4$  - ist H oder OH

$R_5$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, oder Monophosphat-Gruppe, oder Diphosphat-Gruppe oder Triphosphat-Gruppe

3. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt:



10

Wobei:

Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähigen Modifikationen

15

$R_1$  - ist H

$R_2$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal,  $NH_2$ , SH oder geschützte OH-Gruppe

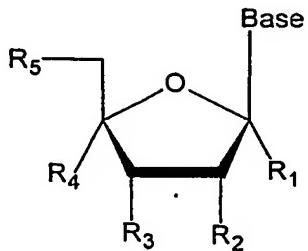
20  $R_3$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe  $O-$   $R_{3-2}$ ,  $P(O)_m$ -  $R_{3-2}$ , wobei  $m$  1 oder 2 ist,  $NH-R_{3-2}$ ,  $S-R_{3-2}$ ,  $Si-R_{3-2}$  oder, wobei  $R_{3-2}$  die Kopplungsstelle des Linkers an das Nukleotid ist

25 L - die Verbindung zwischen Nuk und Linker

$R_4$  - ist H oder OH

30  $R_5$  - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, oder Monophosphat-Gruppe, oder Diphosphat-Gruppe oder Triphosphat-Gruppe

4. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt:



Wobei:

- 5 Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähigen Modifikationen

10 R<sub>1</sub> - ist H

R<sub>2</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, NH<sub>2</sub>, SH oder geschützte OH-Gruppe

R<sub>3</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, PO<sub>3</sub>, SH, NH<sub>2</sub>, O- R<sub>3-1</sub>, P(O)m- R<sub>3-1</sub>, NH-R<sub>3-1</sub>,

15 S-R<sub>3-1</sub>, Si-R<sub>3-1</sub> wobei R<sub>3-1</sub> eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist und m 1 oder 2 ist. .

R<sub>4</sub> - ist H oder OH

R<sub>5</sub> - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe O- R<sub>5-1</sub>-L, oder P-(O)<sub>3</sub>- R<sub>5-1</sub>-L (modifizierte Monophosphat-Gruppe), oder P-(O)<sub>3</sub>-P-(O)<sub>3</sub>-R<sub>5-1</sub>-L (modifizierte Diphosphat-Gruppe) oder P-(O)<sub>3</sub>-P-(O)<sub>3</sub>.P-(O)<sub>3</sub>- R<sub>5-1</sub>-L (modifizierte Triphosphat-Gruppe), wobei R<sub>5-1</sub> die Kopplungsstelle des Linkers an das Nukleotid ist und L - die Verbindung zwischen Nuk und Linker.

25

5. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 4, wobei die Kopplungseinheit (L) folgende strukturelle Elemente einschließt:

R<sub>6</sub>-NH-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-O-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-S-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-SS-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-CO-NH-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-NH-CO-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-CO-O-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-O-CO-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-CO-S-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-S-CO-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-P(O)<sub>2</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-Si-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>,

30

R<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-B-R<sub>7</sub>,

R<sub>6</sub>-(CH=CH-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(A-CH=CH-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(CH=CH-B-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>,

R<sub>6</sub>-A-CH=CH-(CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>, R<sub>6</sub>-(-CH=CH-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-B-R<sub>7</sub>,

$R_6-(C\equiv C-)_n-R_7$ ,  $R_6-(A-C\equiv C-)_n-R_7$ ,  $R_6-(C\equiv C-B-)_n-R_7$ ,  
 $R_6-A-C\equiv C-(CH_2-)_n-R_7$ ,  $R_6-(-C\equiv C-CH_2)_n-B-R_7$ ,

5 wobei  $R_6$  - die Nuk-Komponente ist,  $R_7$  - der Linkerrest ist und A und B folgende strukturelle Elemente einschließen: -NH-, -O-, -S-, -SS-, -CO-NH-, -NH-CO-, -CO-O-, -O-CO-, -CO-S-, -S-CO-, -P(O)<sub>2</sub>-, -Si-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, eine photolabile Gruppe, wobei n - gleich 1 bis 5 ist

10 6. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 5, wobei die Linker-Komponente ein wasserlösliches Polymer einschließt.

7. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 6, wobei die Linker-Komponente wasserlösliche Polymere unabhängig ausgewählt aus folgender Gruppe einschließt:

15 Polyethylen-glycol (PEG), Polysaccharide, Dextran, Polyamide, Polypeptide, Polyphosphate, Polyacetate, Poly(alkyleneglycole), Kopolymere aus Ethylenglycol und Propylenglycol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone), Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(x-Hydroxy-Säuren), Poly-Acrylicsäure, Poly-Acrylamid, Poly(Vinylalkohol).

20 8. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 7, wobei ein Linker-Komponente eine durchschnittliche Länge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 10000, 10000 und 50000 Atome hat.

25 9. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 8, wobei eine Marker-Komponente eine signalgebende, signalvermittelnde, katalytische oder affine Funktion hat

30 10. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 9, wobei eine Marker-Komponente aus einer strukturellen Marker-Einheit besteht

35 11. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 9, wobei eine Marker-Komponente aus mehreren strukturellen Marker-Einheiten gebunden an eine Kern-Komponente besteht

12. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 10 oder 11, wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden strukturellen Elemente einschließt:  
Biotin, Hapten, radioaktives Isotop, seltene Erdenatom, Farbstoff, Fluoreszenzfarbstoff.
- 5
13. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 10 oder 11 , wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt:  
Nanokristalle oder deren Modifikationen, Proteine oder deren Modifikationen, Nukleinsäureketten oder deren Modifikationen, Teilchen oder deren Modifikationen.
- 10
14. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 13, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eines der folgenden Proteine einschließt:  
Enzyme oder deren Konjugate oder Modifikationen,  
Antikörper oder deren Konjugate oder Modifikationen,  
Streptavidin oder seine Konjugate oder Modifikationen,  
Avidin oder seine Konjugate oder Modifikationen
- 15
15. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 13, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eine der folgenden Arten Nukleinsäureketten einschließt: DNA, RNA, PNA, wobei die Länge von Nukleinsäureketten zwischen 10 und 10.000 Nukleotide liegt
- 20
16. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 11 bis 15, wobei die Kernkomponente der Marker-Komponente unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt: wasserlöslichen Polymer aus der Gruppe von: Polyamide (z.B. Polypeptide), Poly-Acrysäure und deren Derivate, Poly-Acrylamide und deren Derivate, Poly-Vinylalkohole und deren Derivate, Nukleinsäuren und deren Derivate, Streptavidin oder Avidin und deren Derivate, Dendrimere, wobei diese Elemente linear oder verzweigt oder unter einander vernetzt sein können
- 25
17. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 9, 11 bis 16, wobei die Verbindung zwischen mehreren strukturellen Marker-Einheiten und der Kern-Komponente kovalent oder affine erfolgt.
- 30
- 35

18. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 10, wobei die Verbindung zwischen einer strukturellen Marker-Einheit und dem Linker kovalent oder affine erfolgt

5           19. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 9, 11 bis 17, wobei die Verbindung zwischen der Kern-Komponente und dem Linker kovalent oder affine erfolgt

10          20. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 19, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt.

15          21. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 20, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und die Linker-Komponente eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

20          22. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 21, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, daß nur eine Nuk-Komponente in einen wachsenden Strang eingebaut werden kann.

25          23. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 19 wobei mehrere Nuk-Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt sind, wobei die Länge der jeweiligen Linker- Komponente zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt.

24. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 19, 23, wobei mehrere Nuk-Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt, wobei die Länge der jeweiligen Linker- Komponente zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und der jeweilige Linker eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

5

25. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 19, 23, 24, wobei mehrere Nuk-Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt, wobei die Länge der jeweiligen Linker- Komponente zwischen 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000 Atome beträgt und ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, daß nur eine Nuk-Komponente in eine wachsende Nukleinsäurekette eingebaut werden kann.

10

15 26. Oligonucleotide oder Polynucleotide die mindestens ein Nuk-Makromolekül nach Ansprüchen 1 bis 25 pro eine Nukleinsäurekette einschließen.

20

27. Oligonucleotide oder Polynucleotide nach Anspruch 26, wobei Oligo- oder Polynucleotide RNA, DNA oder PNA sind, deren Länge zwischen 5 und 50.000 Nukleotide beträgt.

25 28. Verfahren zur Modifizierung von Nukleinsäureketten, wobei für die Kopplung Nuk-Makromoleküle nach Ansprüchen 1 bis 25 verwendet werden

25

30 29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Modifizierung durch eine enzymatische Kopplung erfolgt und das Reaktionsgemisch folgende Komponenten einschließt:

30

- mindestens eine Art der Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenstufen nach Ansprüchen 1 bis 25, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt
- mindestens eine Population der Nukleinsäureketten,
- mindestens eine Enzymart zur Kopplung von Nuk-Makromoleküle an die Nukleinsäureketten,

35

30. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Modifizierung durch eine enzymatische Kopplung erfolgt und das Reaktionsgemisch folgende Komponenten einschließt:

- mindestens eine Art der Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenstufen nach Ansprüchen 1-25, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt

- mindestens eine Population der Nukleinsäureketten,

5 - mindestens eine Enzymart zur Kopplung von Nuk-Makromoleküle an die Nukleinsäureketten  
- mindestens eine weitere Art von Nukleosidtriphosphaten

10 31. Verfahren nach Ansprüchen 29, 30, wobei die Enzymart unabhängig eine der folgenden Gruppen einschließt: DNA-Polymerase, RNA-Polymerase, Terminale Transferase,

15 32. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die "weitere Art" der Nukleosidtriphosphaten unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe von: Ribonukleosidtriphosphaten (ATP, GTP, UTP, CTP), von 2'-Deoxyribonukleosidtriphosphaten (dATP, dUTP, dTTP, dCTP, dGTP), von 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddATP, ddGTP, ddUTP, ddCTP, ddTTP).

20 33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die "weitere Art" der Nukleosidtriphosphaten konventionell modifizierte Nukleotide mit einer Markierung sind, wobei diese Markierung unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe von: ein Fluoreszenzfarbstoff, ein Biotin, ein Hapten, ein radioaktives Element.

25 34. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 33, wobei mindestens zwei unterschiedliche Populationen an Nukleinsäureketten präsent sind

30 35. Verfahren nach Anspruch 34, wobei mindestens eine der Populationen der Nukleinsäureketten eine Primer-Funktion hat und mindestens eine Population der Nukleinsäureketten eine Matrizen-Funktion.

36. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Modifizierung durch eine chemische Kopplung erfolgt, wobei die Kopplung der Nuk-Makromoleküle an Nukleinsäureketten durch Phosphoroamidit-Kopplung erfolgt.

5           37. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 36, wobei im Markierungsverfahren Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die die Kopplung nur einer einzigen Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäure-Strang zulassen und der mehrfache Einbau durch Modifikationen an der Nuk-Komponente, und/oder der Linker-Komponente und/oder der Marker-Komponente verhindert wird.

10          38. Verfahren nach Anspruch 37, wobei die weitere Kopplung reversibel verhindert wird.

15          39. Verfahren nach Anspruch 37, wobei die weitere Kopplung irreversibel verhindert wird.

20          40. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 36, wobei im Markierungsverfahren Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die eine Kopplung mehrerer Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäurestrang zulassen

25          41. Verfahren nach Ansprüchen 28-40, wobei die an der Reaktion teilnehmenden Nukleinsäureketten an eine feste Phase gekoppelt sind und adressierbare Positionen haben.

30          42. Verfahren nach Anspruch 41, wobei die Nukleinsäureketten eine einheitliche Population darstellen

25          43. Verfahren nach Anspruch 41, wobei die Nukleinsäureketten zwei oder mehrere unterschiedliche Populationen darstellen und jede der Populationen eine adressierbare Position auf der festen Phase hat

30          44. Verfahren nach Ansprüchen 41,42, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen an einer Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach der Kopplung am verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird.

5        45. Verfahren nach Ansprüchen 41,42, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen an einer Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Kopplung oder nach der Kopplung von der in den wachsenden Nukleinsäurestrang eingebauten Nuk-Komponente abgetrennt wird.

10      46. Verfahren nach Ansprüchen 41,43, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen in einem Reaktionsansatz parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei diese Populationen jeweils unterschiedliche adressierbare Positionen an der festen Phase haben und die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach der Kopplung am verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird.

15

20      47. Verfahren nach Ansprüchen 41,43, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen in einem Reaktionsansatz parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei diese Populationen unterschiedliche adressierbare Positionen an der festen Phase haben und die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Kopplung oder nach der Kopplung von der Nuk-Komponente abgetrennt wird.

25

48. Verfahren nach Ansprüchen 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen auf der festen Phase als Spots auf einer planen Oberfläche verteilt sind, wobei pro ein Spot Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

30

49. Verfahren nach Ansprüchen 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen an den Kugelchen bzw. Partikel befestigt sind, wobei pro ein Kugelchen Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

35

50. Verfahren nach Ansprüchen 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen in einem Multigefäßsystem, wie Mikrotiterplatte oder Nanotiterplatte oder Pikotiterplatte, verteilt sind, wobei in einem Gefäß des Multigefäßsystems die Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

51. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 35 und 37 bis 50, das folgende Schritte einschließt:

- 5           a) Bereitstellung mindestens einer Population an einzelsträngigen Nukleinsäureketten
- 10          b) Hybridisierung von Primern an diese Nukleinsäureketten, wobei extensionsfähige NSK-Primer-Komplexe entstehen
- 15          c) Inkubation von mindestens einer Art der Nuk-Makromoleküle nach Ansprüchen 1 bis 25 zusammen mit einer Art der Polymerase nach Anspruch 31 mit den in Schritten a und b bereitgestellten NSK-Primer-Komplexen unter Bedingungen, die den Einbau von komplementären Nuk-Makromolekülen zulassen, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt.
- 20          d) Entfernung der nicht eingebauten Nuk-Makromoleküle von den NSK-Primer-Komplexen
- 25          e) Detektion der Signale von in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
- 30          f) Entfernung der Linker-Komponente und der Marker-Komponente von den in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
- 35          g) Waschen der NSK-Primer-Komplexe  
gegebenenfalls Wiederholung der Schritte (c) bis (g).

52. Verfahren nach Ansprüchen 28-40, wobei die Nukleinsäureketten an eine feste Phase in zufälliger Anordnung gekoppelt sind.

53. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 41, 52 zur parallelen Sequenzanalyse von Nukleinsäuresequenzen (Nukleinsäureketten, NSKs), bei dem man

- 30          Fragmente (NSKFs) einzelsträngiger NSKs mit einer Länge von etwa 50 bis 1000 Nukleotiden erzeugt, die überlappende Teilsequenzen einer Gesamtsequenz darstellen können, man
  - 35          die NSKFs unter Verwendung eines einheitlichen oder mehrerer unterschiedlichen Primer in Form von NSK-Primer-Komplexen auf einer Reaktionsoberfläche in einer zufälligen Anordnung bindet, man

eine zyklische Aufbaureaktion des komplementären Stranges der NSKFs unter Verwendung einer oder mehrerer Polymerasen durchführt, indem man

a) zu den auf der Oberfläche gebundenen NSKF-Primer-Komplexen eine Lösung zugibt, die eine oder mehrere Polymerasen und ein bis vier Nuk-Makromoleküle enthält, die eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Marker-Komponente haben, wobei die bei gleichzeitiger Verwendung von mindestens zwei Nuk-Makromolekülen jeweils an die Marker-Komponente befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe so gewählt sind, dass sich die verwendeten Nuk-Makromoleküle durch Messung unterschiedlicher Fluoreszenzsignale voneinander unterscheiden lassen, wobei die Nuk-Makromoleküle strukturell so modifiziert sind, dass die Polymerase nach Einbau eines solchen Nuk-Makromoleküls in einen wachsenden komplementären Strang nicht in der Lage ist, ein weiteres Nuk-Makromolekül in denselben Strang einzubauen, wobei die Linker-Komponente mit der Marker-Komponente abspaltbar sind, man

b) die in Stufe a) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen inkubiert, die zur Verlängerung der komplementären Stränge geeignet sind, wobei die komplementären Stränge jeweils um ein Nuk-Makromolekül verlängert werden, man

c) die in Stufe b) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung nicht in einen komplementären Strang eingebauter Nuk-Makromoleküle geeignet sind, man

d) die einzelnen, in komplementäre Stränge eingebauten Nuk-Makromoleküle durch Messen des für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Signals detektiert, wobei man gleichzeitig die relative Position der einzelnen Fluoreszenzsignale auf der Reaktionsoberfläche bestimmt, man

e) zur Erzeugung unmarkierter (NTs oder) NSKFs die Linker-Komponente und die Marker-Komponente von den am komplementären Strang angefügten Nuk-Komponenten abspaltet, man

f) die in Stufe e) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung der Marker-Komponente geeignet sind, man

die Stufen a) bis f) gegebenenfalls mehrfach wiederholt,

5 wobei man die relative Position einzelner NSK-Primer-Komplexe auf der Reaktionsoberfläche und die Sequenz dieser NSKs durch spezifische Zuordnung der in Stufe d) in aufeinanderfolgenden Zyklen an den jeweiligen Positionen detektierten Fluoreszenzsignale zu den Nuk-Makromolekülen bestimmt.

10 54. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus nur jeweils eine Art der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

15 55. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus jeweils zwei unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

20 56. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus jeweils vier unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

25 57. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass die NSKs Varianten einer bekannten Referenzsequenz sind und man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in den Zyklen abwechselnd jeweils zwei unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle und zwei unmarkierte NTs einsetzt und man die Gesamtsequenzen durch Vergleich mit der Referenzsequenz ermittelt.

30 58. Verfahren nach den Ansprüchen 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man in die NSKs jeweils eine Primerbindungsstelle (PBS) einführt, wobei man bei doppelsträngigen NSKs an beiden komplementären Einzelsträngen jeweils eine PBS einführt und wobei die Primerbindungsstellen für alle NSKs jeweils gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen.

5           59. Verfahren nach den Ansprüchen 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man die NSKFs mit Primern in einer Lösung unter Bedingungen in Kontakt bringt, die zur Hybridisierung der Primer an die Primerbindungsstellen (PBSs) der NSKFs geeignet sind, wobei die Primer untereinander gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen, und man die gebildeten NSKF-Primer-Komplexe anschließend auf der Reaktionsoberfläche bindet.

10           60. Verfahren nach den Ansprüchen 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man die NSKFs zunächst auf der Reaktionsoberfläche immobilisiert und erst anschließend mit Primern unter Bedingungen in Kontakt bringt, die zur Hybridisierung der Primer an die Primerbindungsstellen (PBSs) der NSKFs geeignet sind, wobei NSKF-Primer-Komplexe gebildet werden, wobei die Primer untereinander gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen.

15           61. Verfahren nach Ansprüchen 53 bis 60, bei dem an 10 bis 100.000 unterschiedlichen Sequenzenpopulationen die Einbaureaktion parallel durchgeführt

20           62. Verfahren nach Ansprüchen 53 bis 60, bei dem an 100.000 bis 100.000.000 unterschiedlichen Sequenzenpopulationen die Einbaureaktion parallel durchgeführt.

25           63. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 62, wobei die Sequenzen der Nukleinsäureketten ermittelt werden

64. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 63, wobei die Marker-Komponente fluoreszent markiert ist

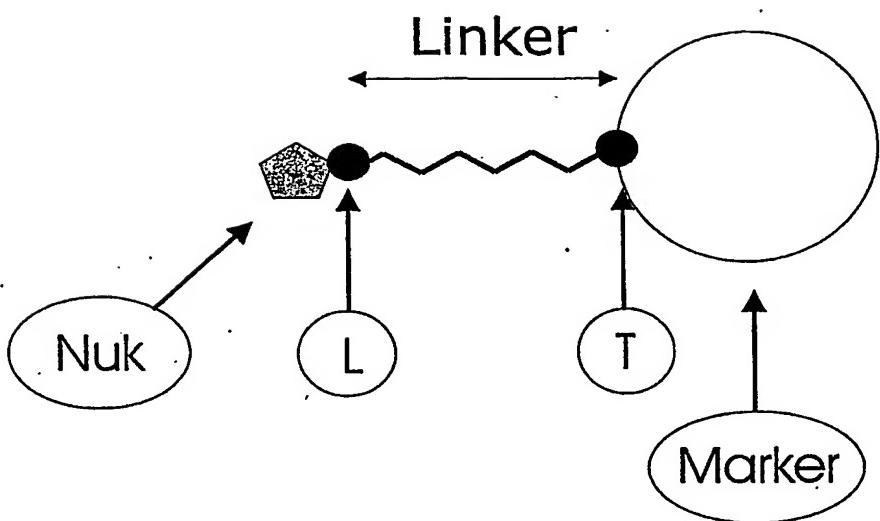
30           65. Verfahren nach Ansprüchen 41 bis 64, wobei die feste Phase unabhängig aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Silicon, Glas, Keramik, Kunststoffe, Gele oder deren Modifikationen

66. Ein Kit, das die makromolekularen Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 25 einschließt.

**Zusammenfassung:**

Die Erfindung beschreibt eine neue Klasse von Nukleotiden, die als Substrate für Enzyme eingesetzt werden, z.B. zur Markierung von Nukleinsäuren.

Fig. 1



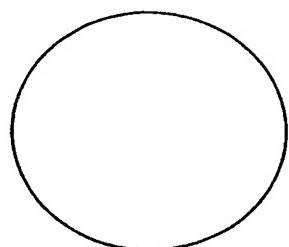
Legende:



Nuk-Komponente

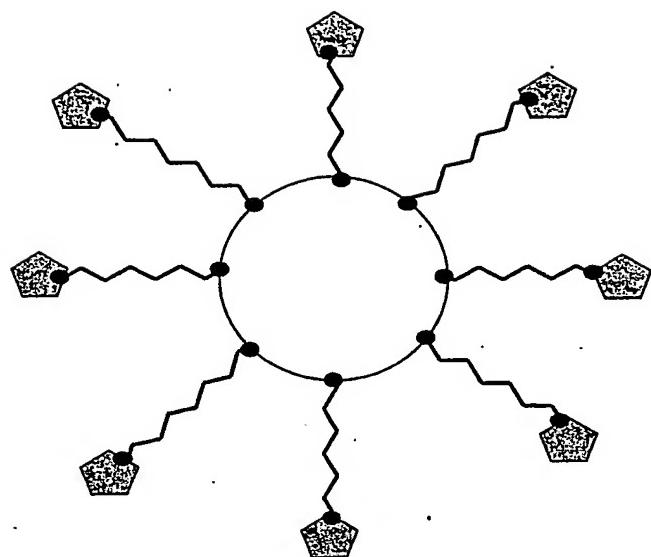


Linker-Komponente



Marker-Komponente

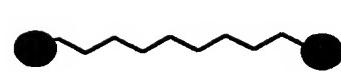
Fig. 2



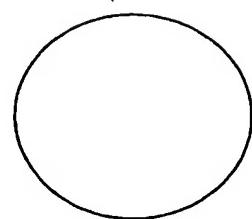
Legende:



Nuk-Komponente



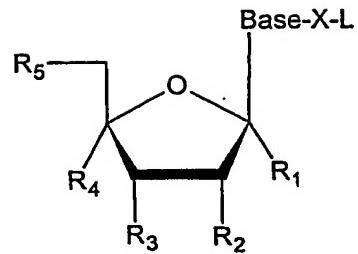
Linker-Komponente



Marker-Komponente

Fig. 3

A)



B)

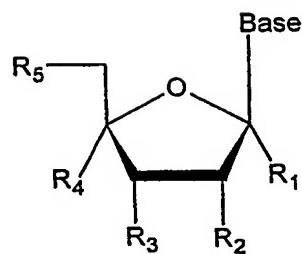
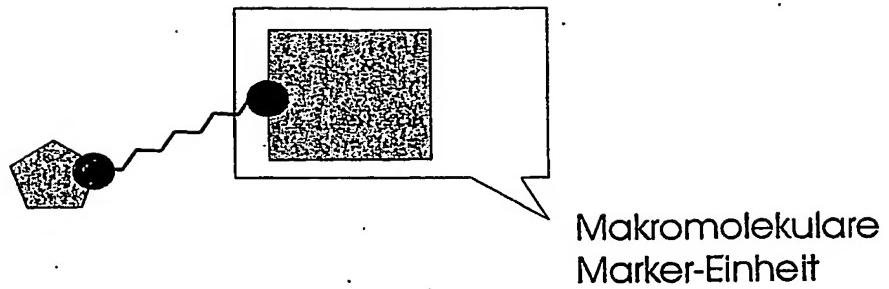
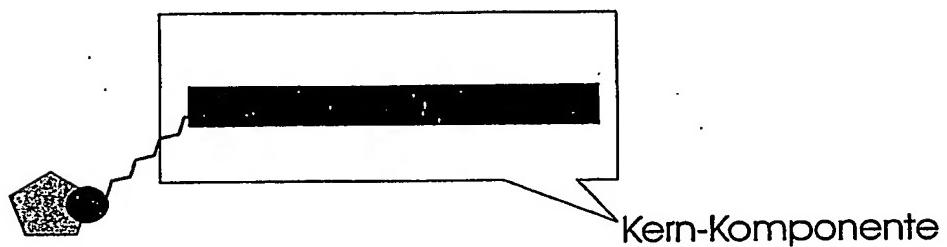


Fig. 4

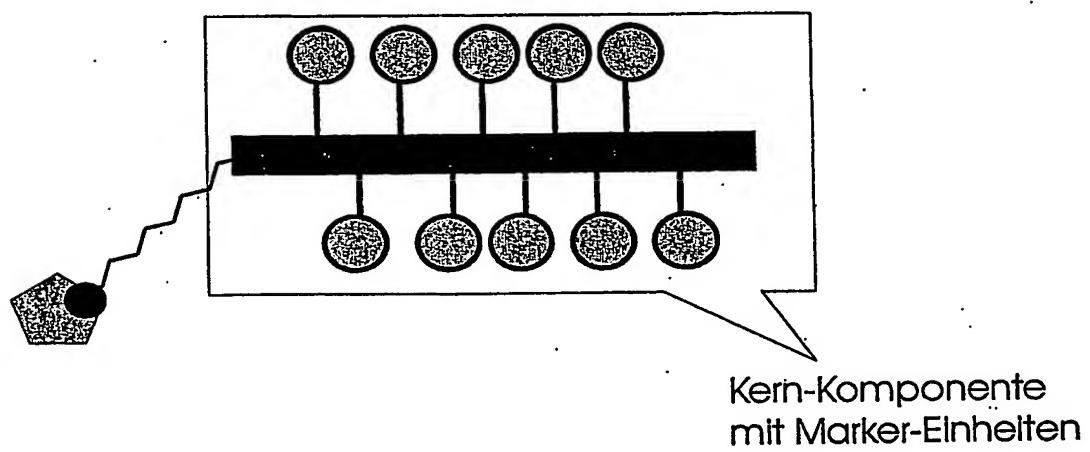
A)



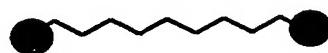
B)



C)



Legende:

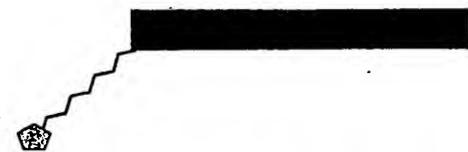


Nuk-Komponente

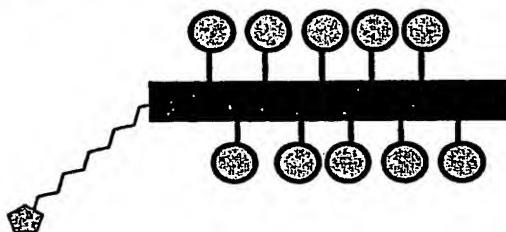
Linker-Komponente

Fig. 5

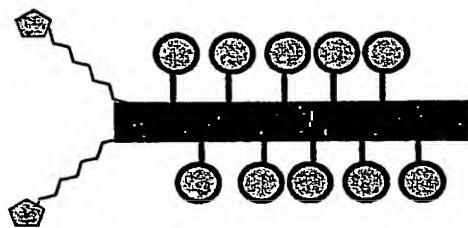
A)



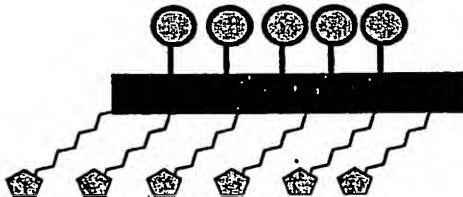
B)



C)



D)

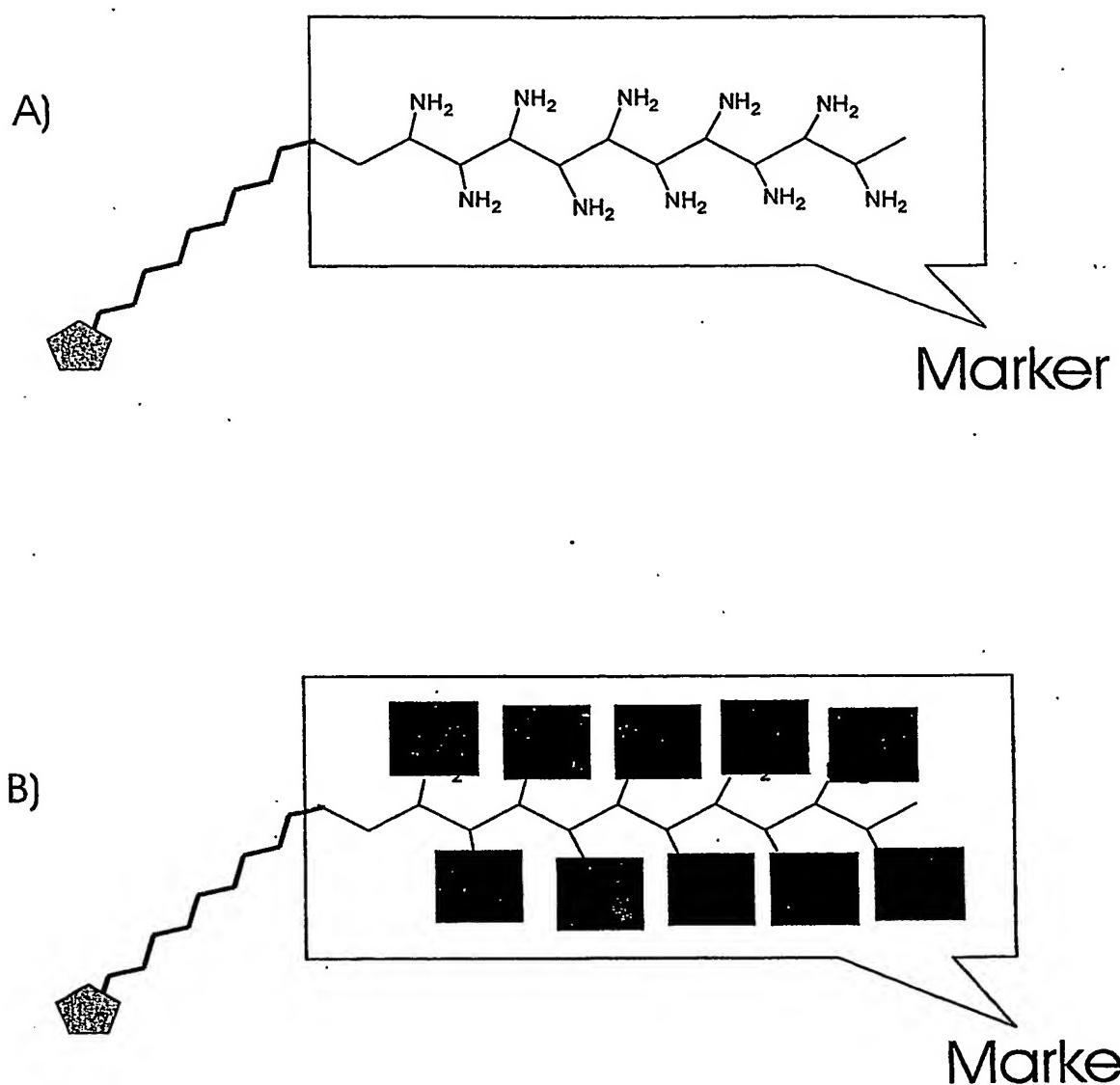


Legende:



Nuk-Komponente   Linker-Komponente   Kern-Komponente   Marker-Einhalt  
an einem Linker

Fig. 6



Legende:



Nuk-Komponente



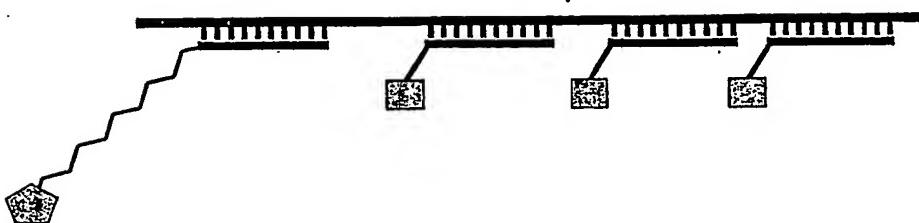
Linker-Komponente



Signalgebende  
Marker-Einheit

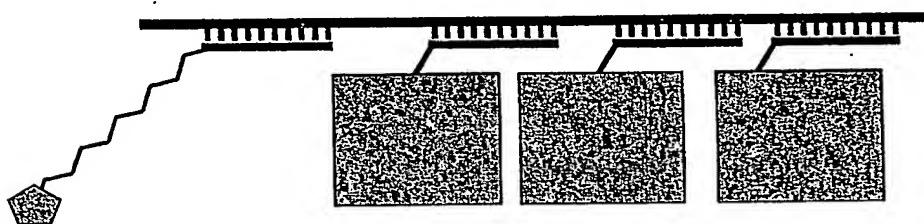
Fig. 7

A)



Nukleinsäure als Kern-Komponente

C)



Legende:



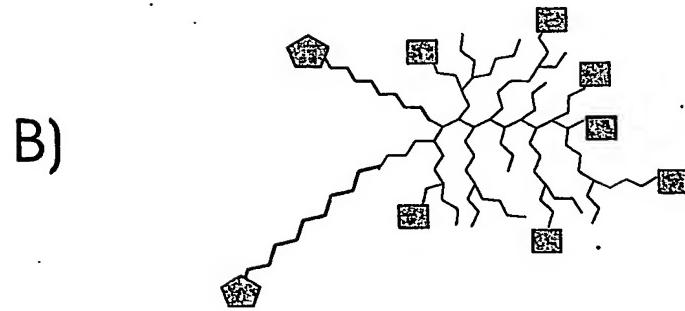
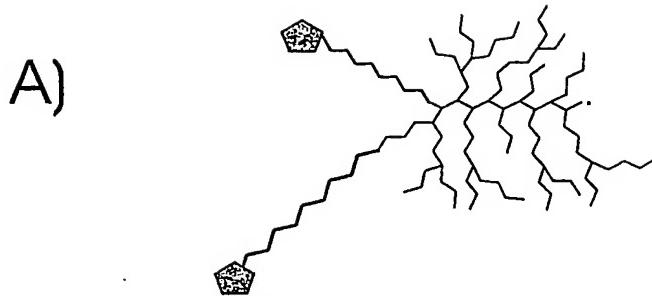
Nuk-Komponente

Linker-Komponente

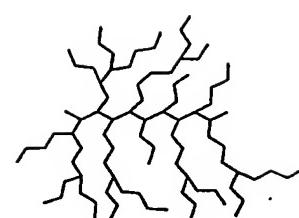
Signalgebende  
Marker-Einheit

Nucleinsäure mit  
einer signalgebenden  
Marker-Einheit

Fig. 8



Legende:



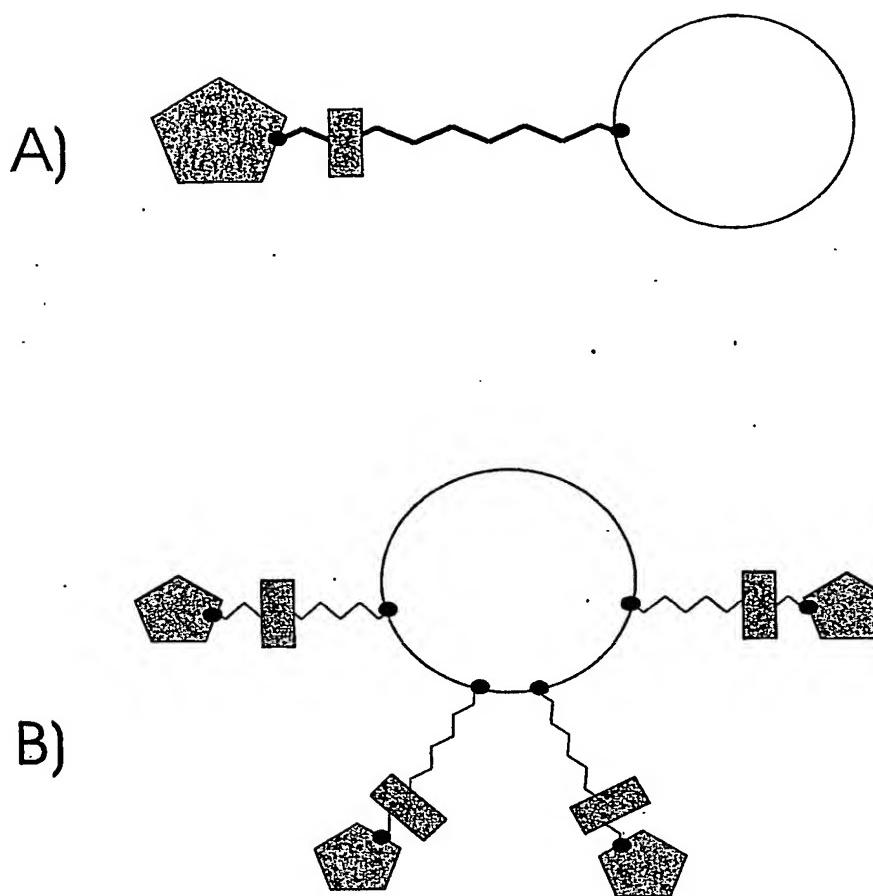
Nuk-Komponente

Linker-Komponente

Signalgebende  
Marker-Einheit

Verzweigtes Polymer  
als Kern-Komponente,  
z.B. Dendrimer

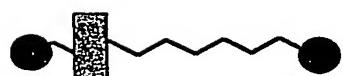
Fig. 9



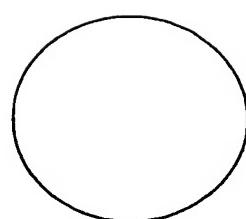
Legende:



Nuk-Komponente



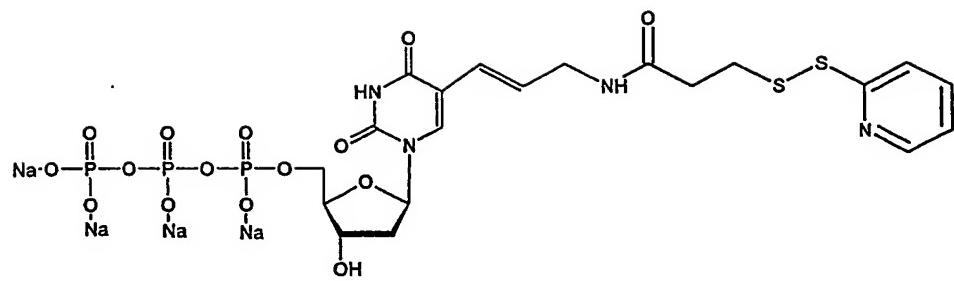
Linker-Komponente  
mit einer  
spaltbaren Verbindung



Marker-Komponente

Fig. 10

A)



B)

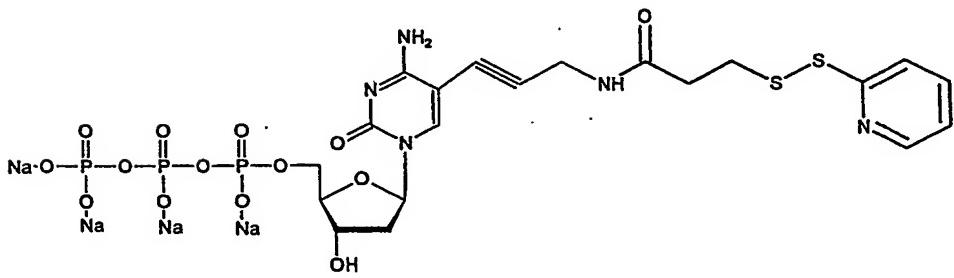


Fig. 11

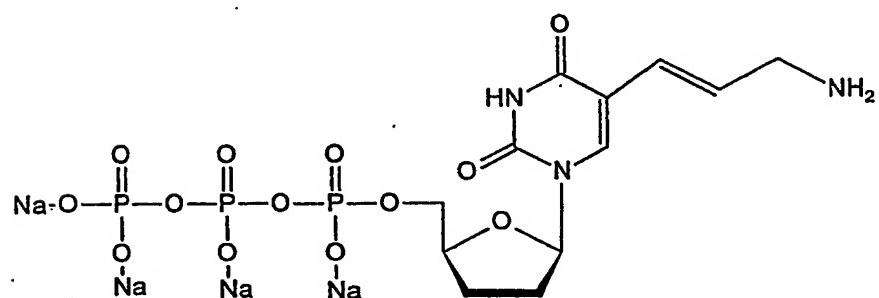
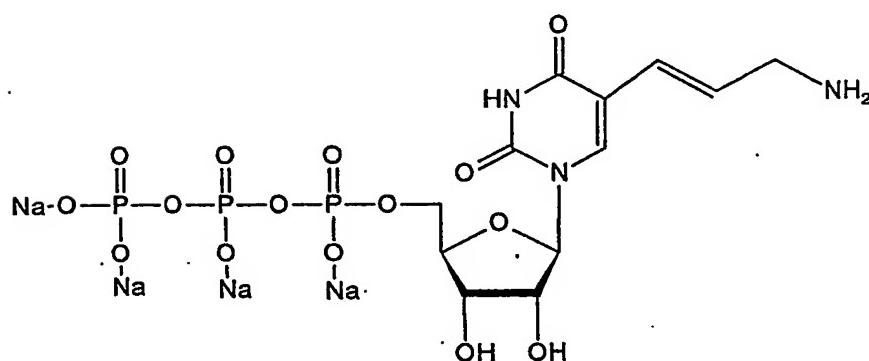
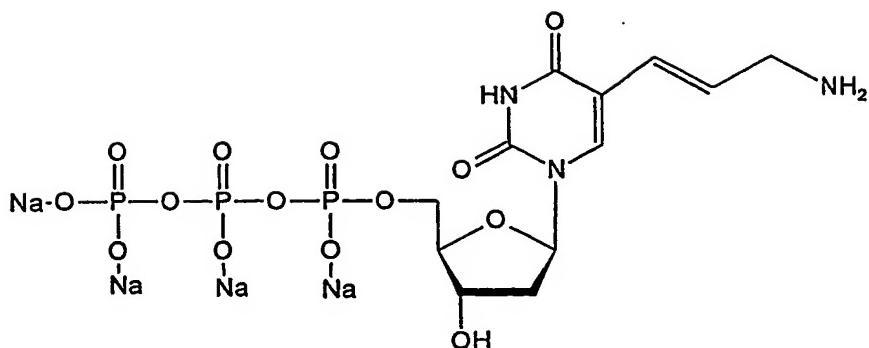


Fig. 12

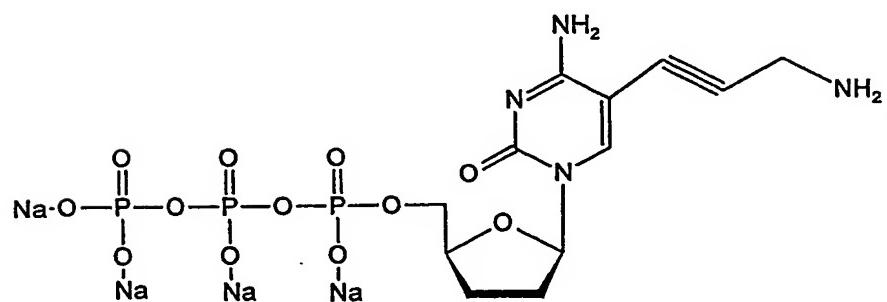
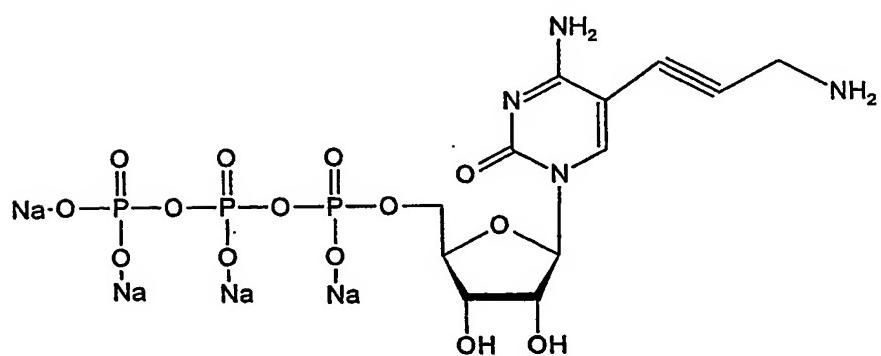
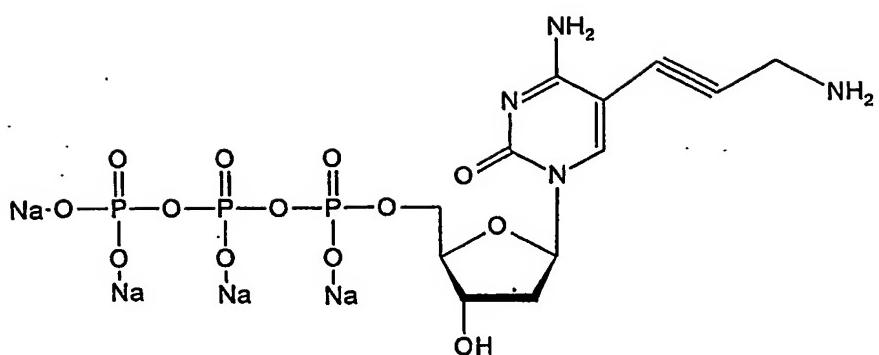


Fig. 13

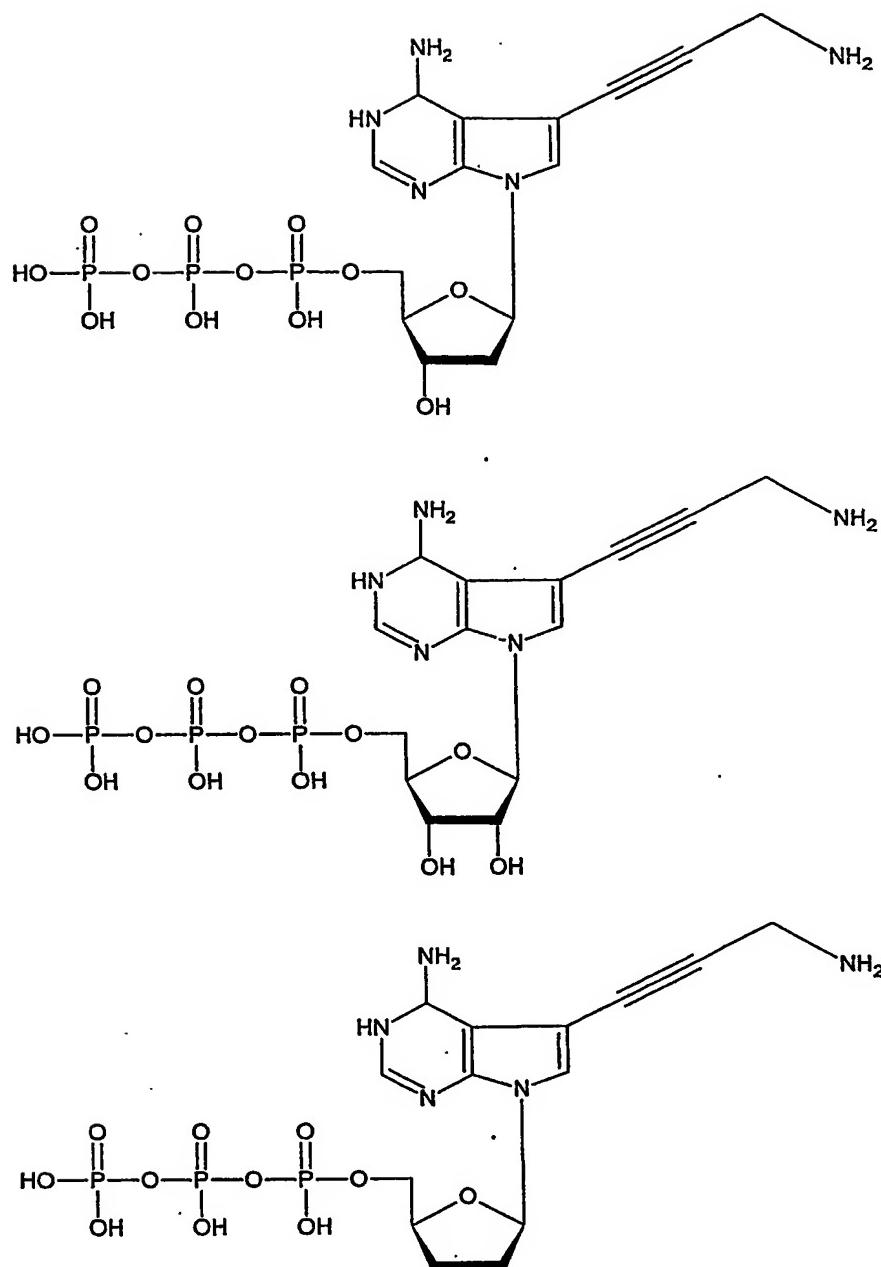


Fig. 14

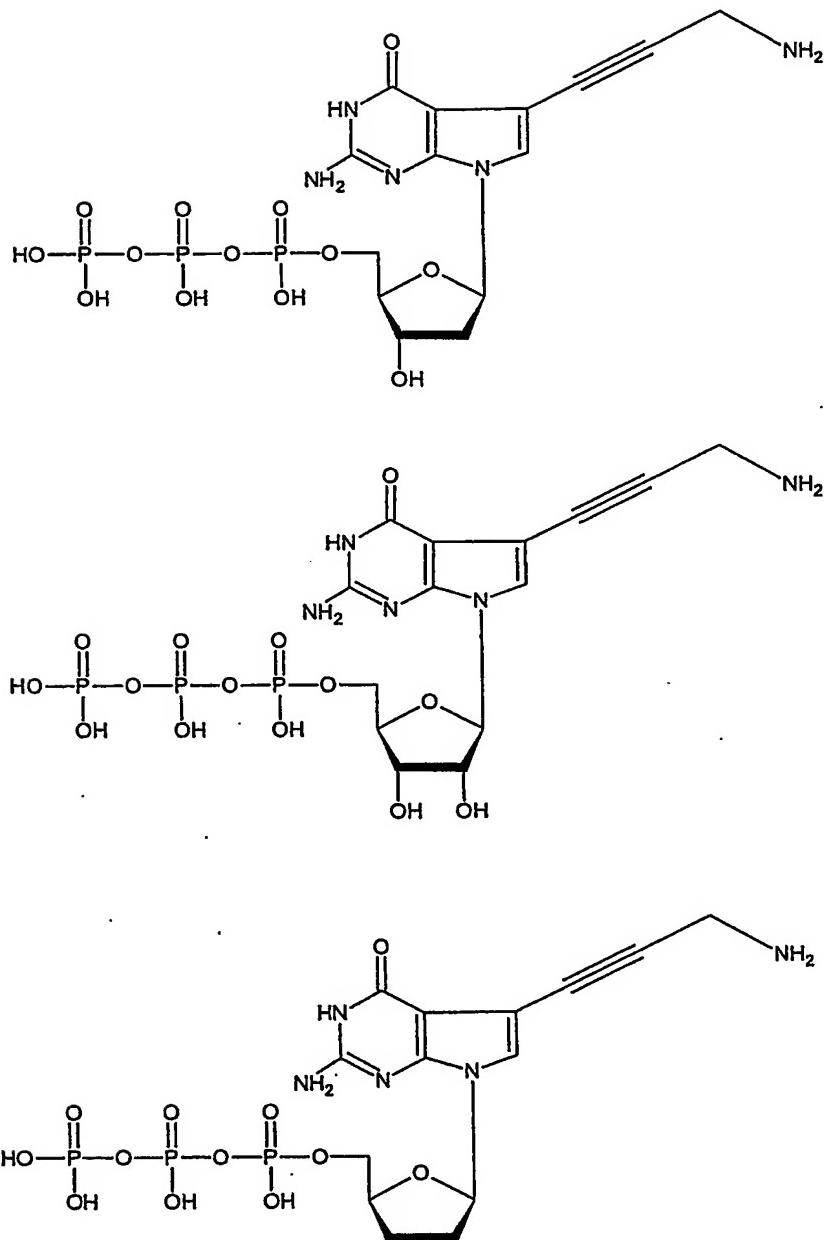


Fig. 15

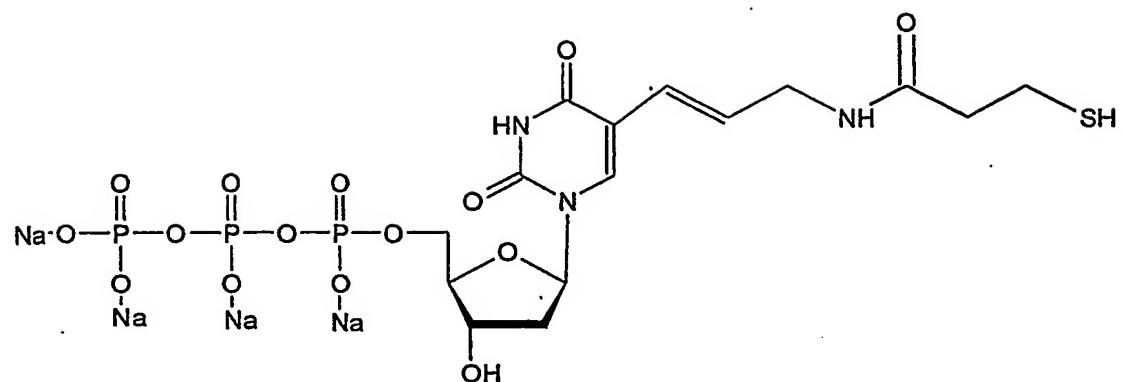


Fig. 16

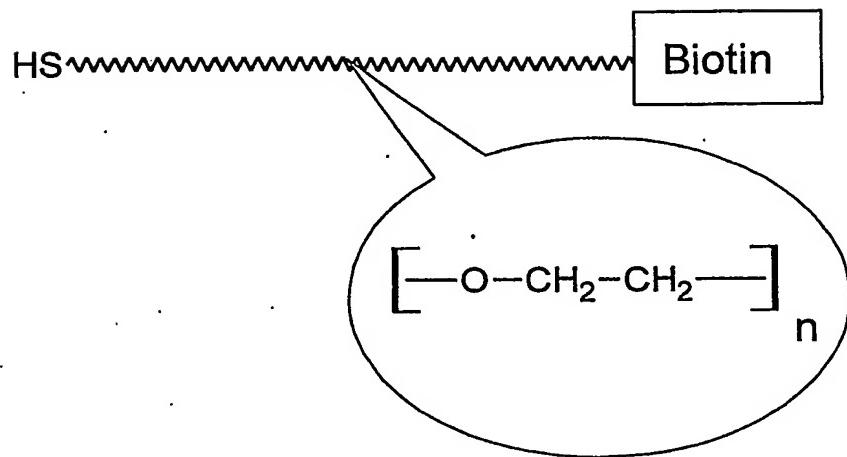


Fig. 17

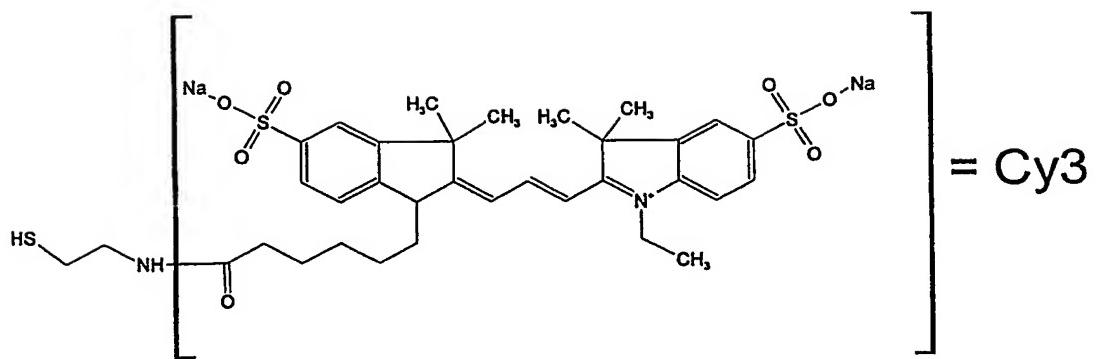


Fig. 18

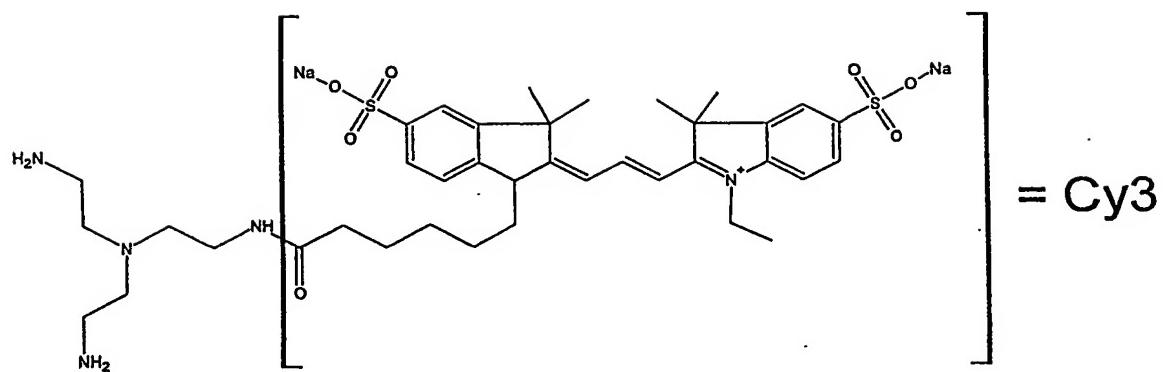


Fig. 19

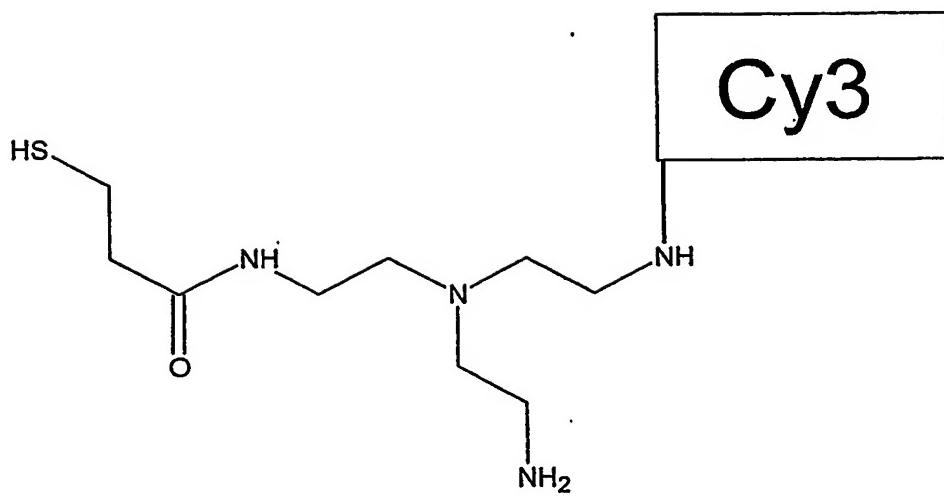


Fig. 20

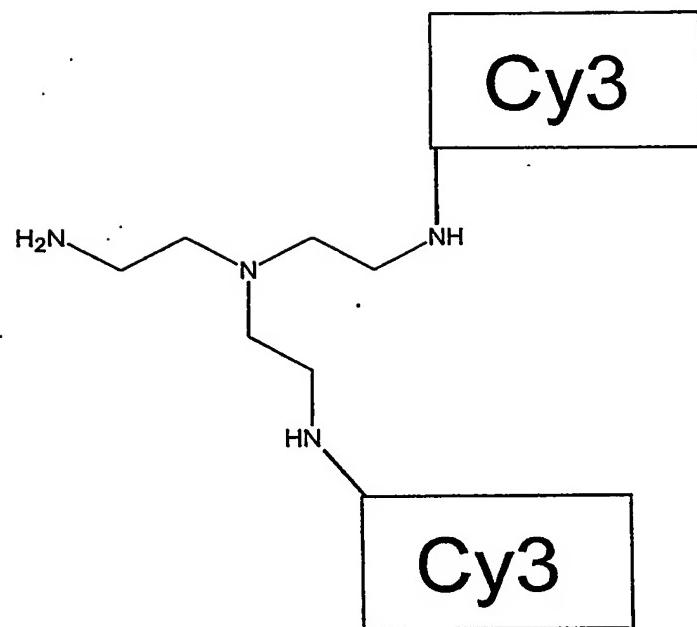


Fig. 21

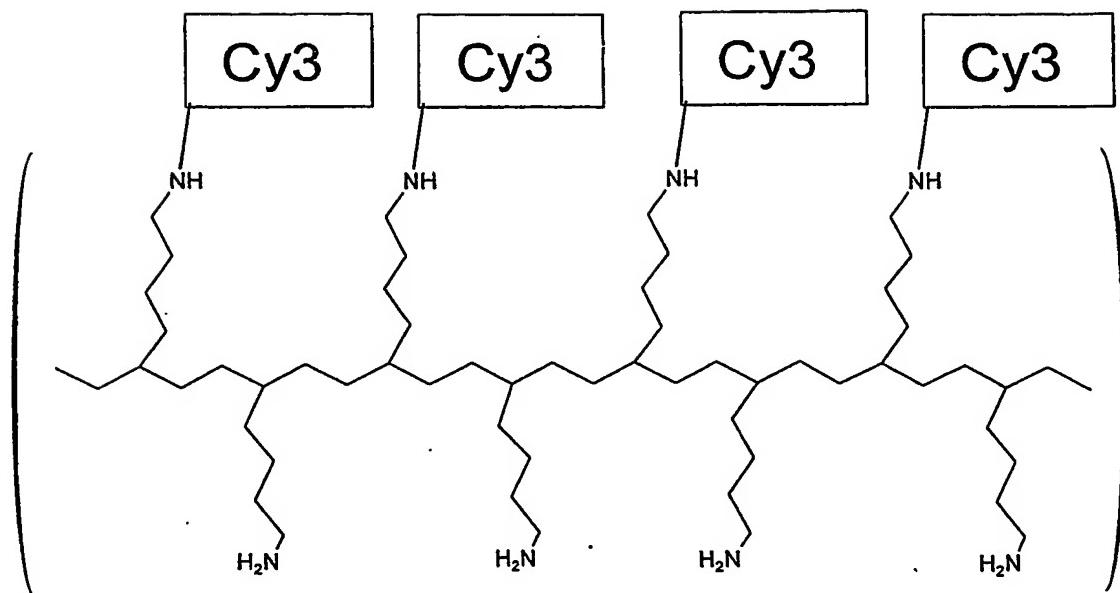


Fig. 22

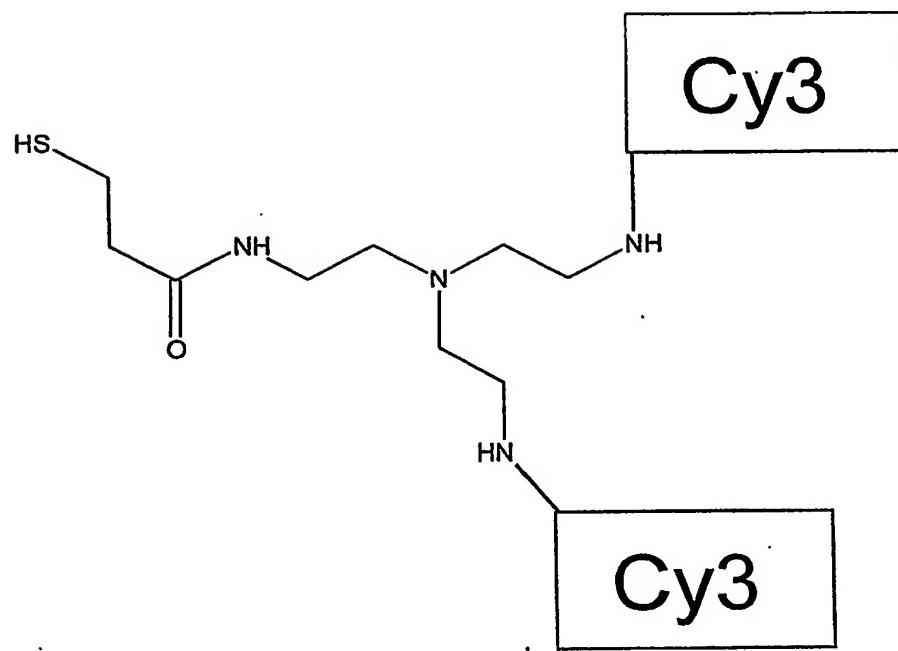


Fig. 23

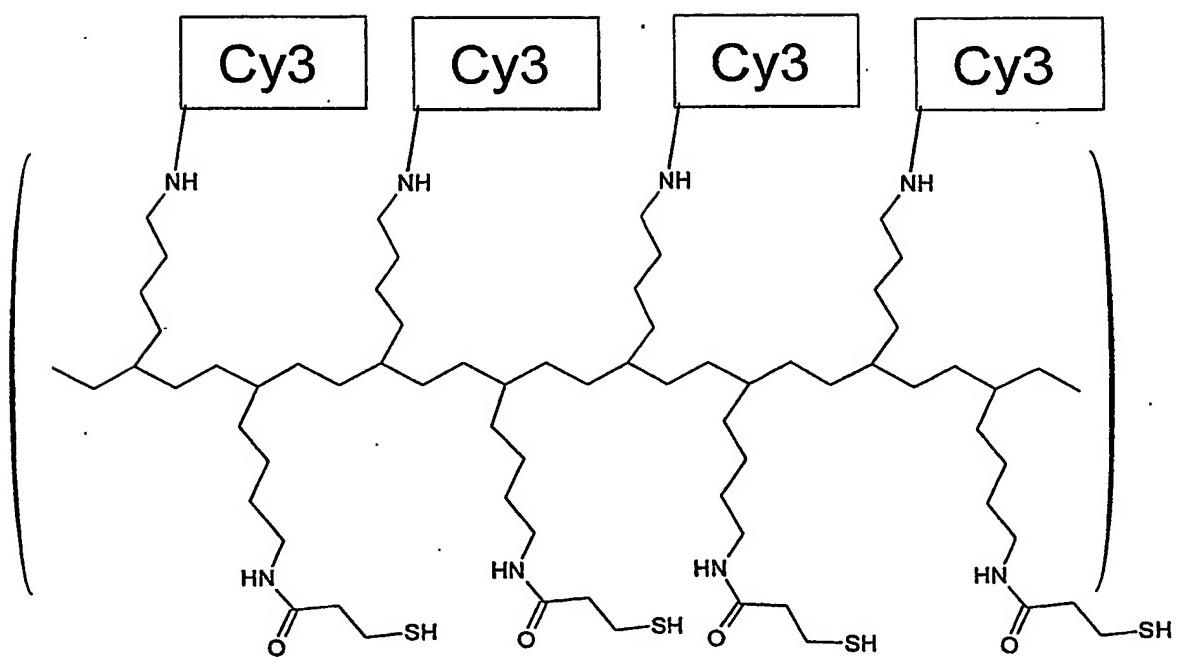
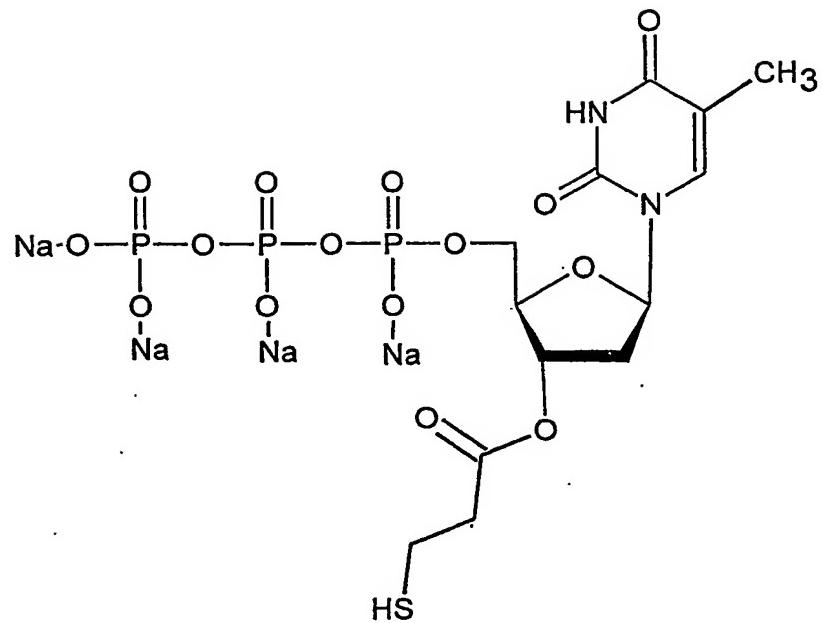


Fig. 24

A)



B)

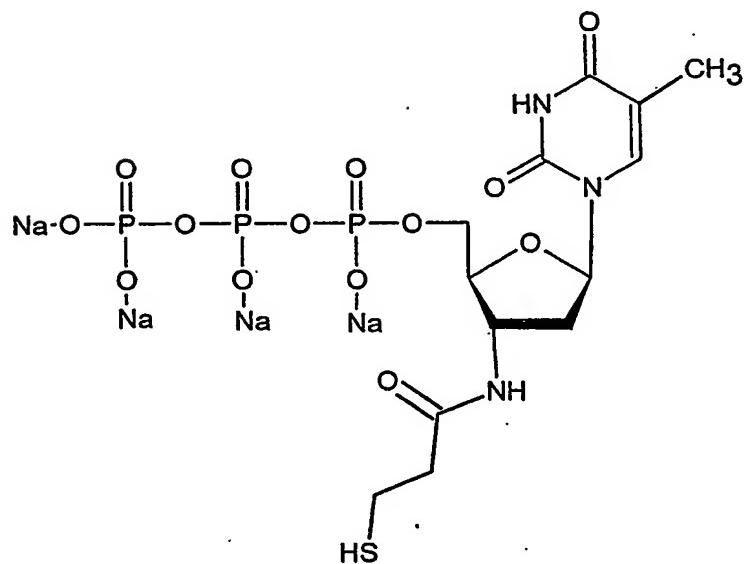


Fig. 25

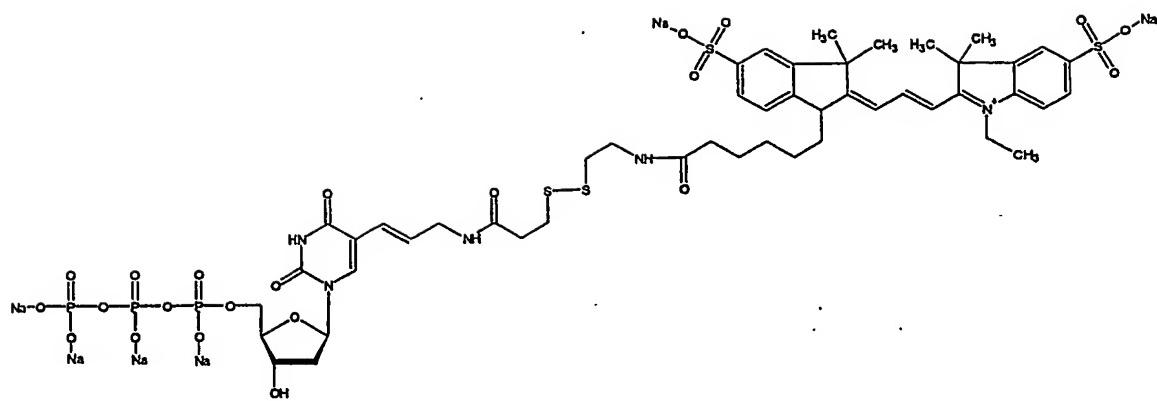


Fig. 26

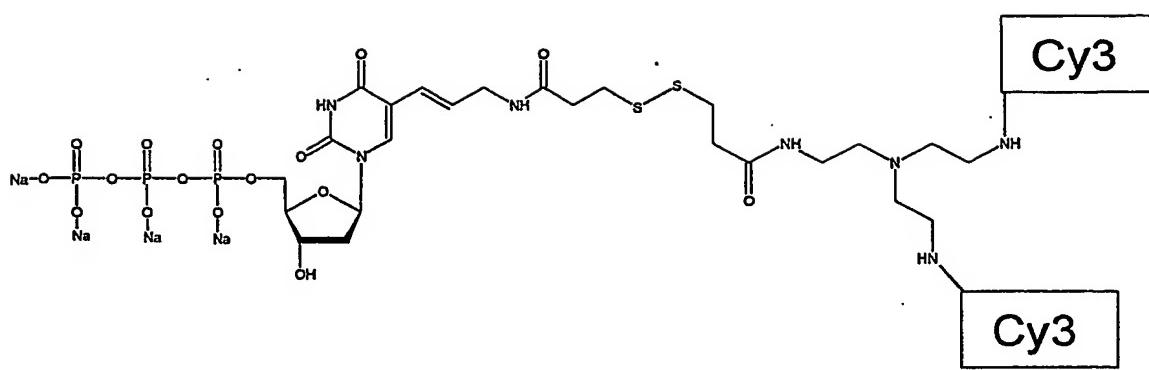


Fig. 27

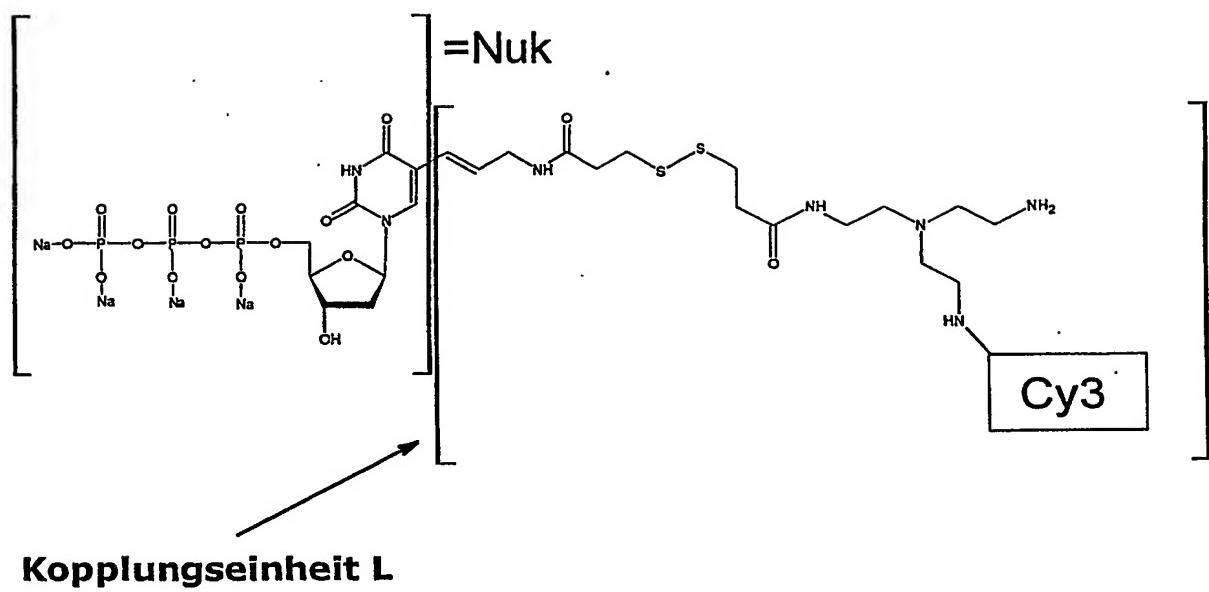
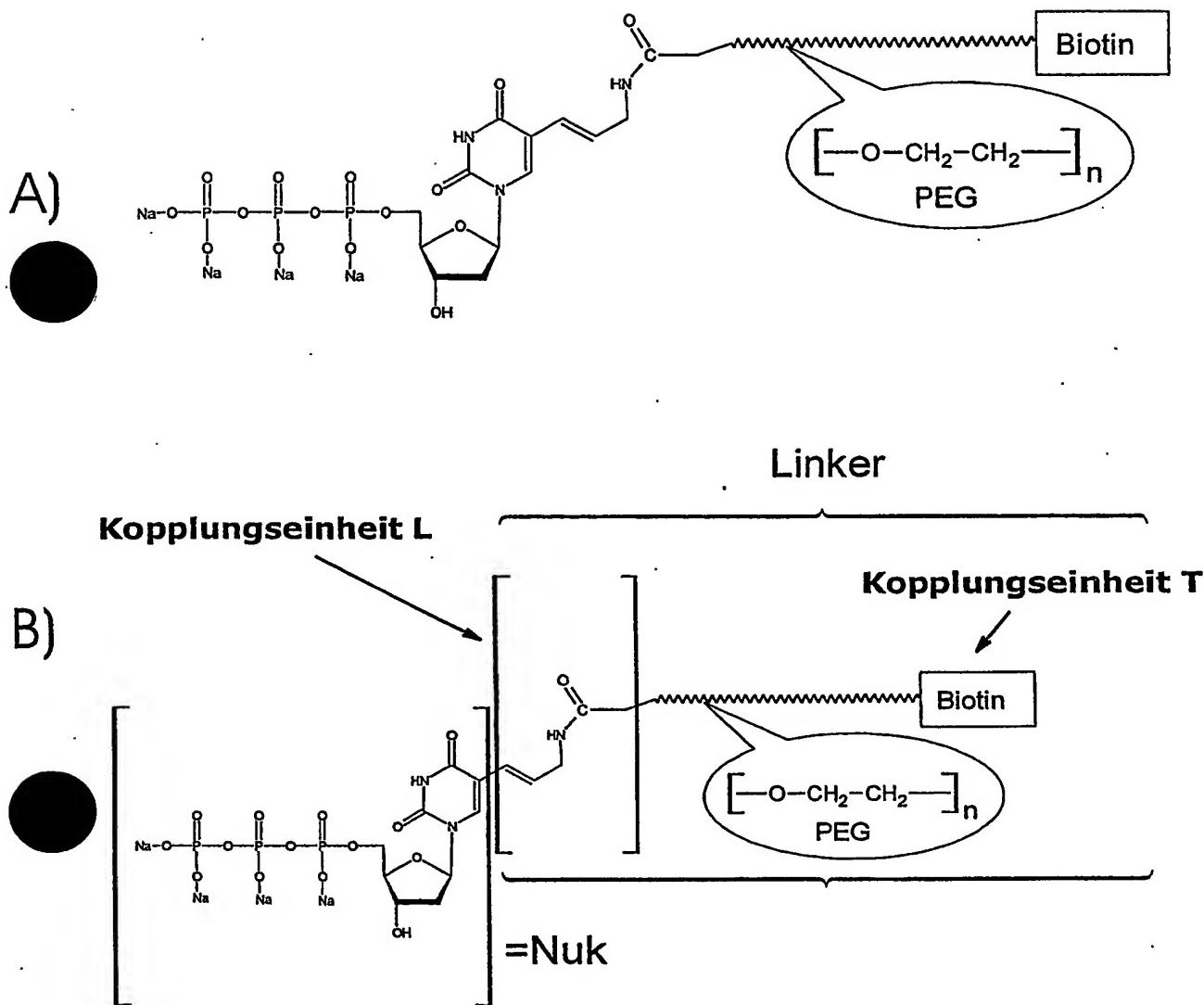


Fig. 28



Legende:

- A) Chemische Struktur der Nuk-Linker-Komponente
- B) Schematische Aufteilung in einzelne Komponenten

Fig. 29

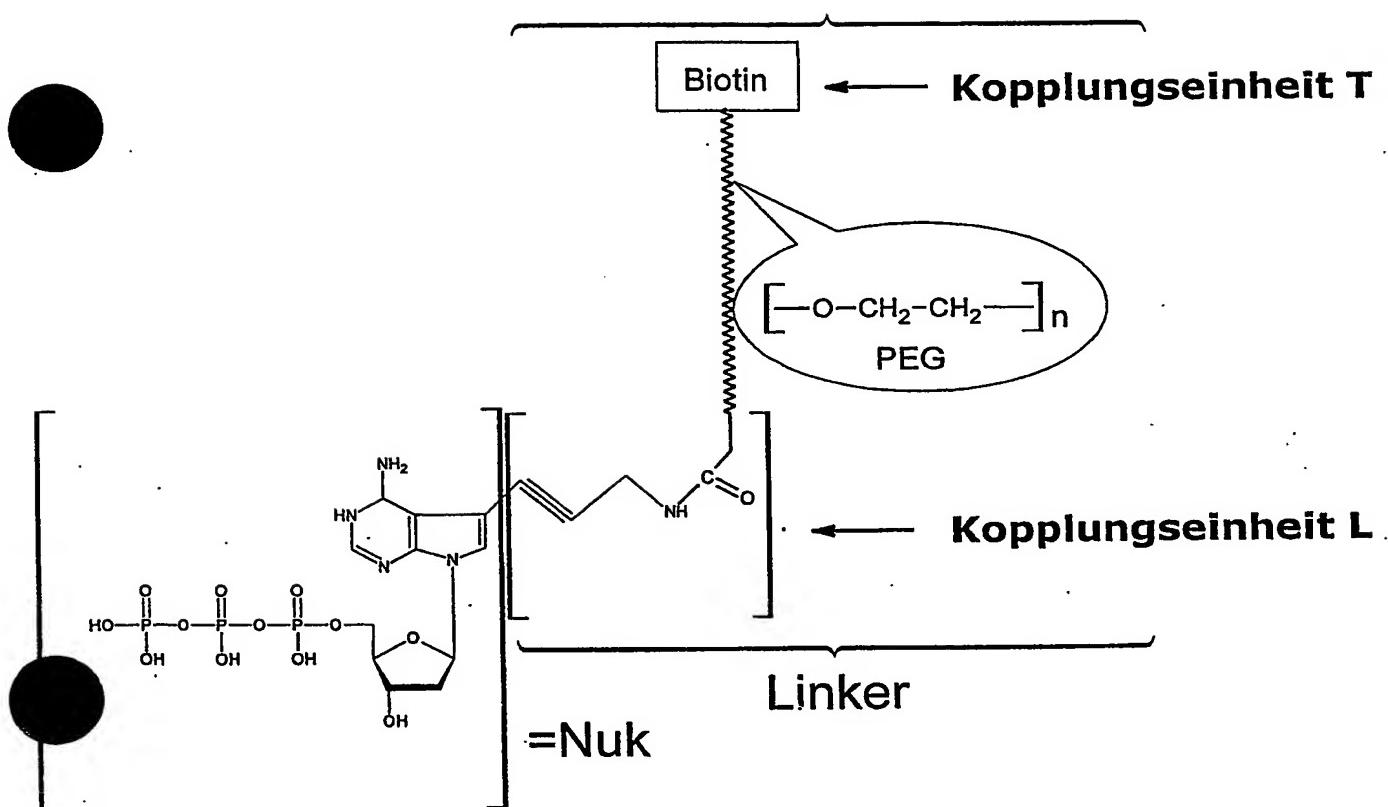


Fig. 30

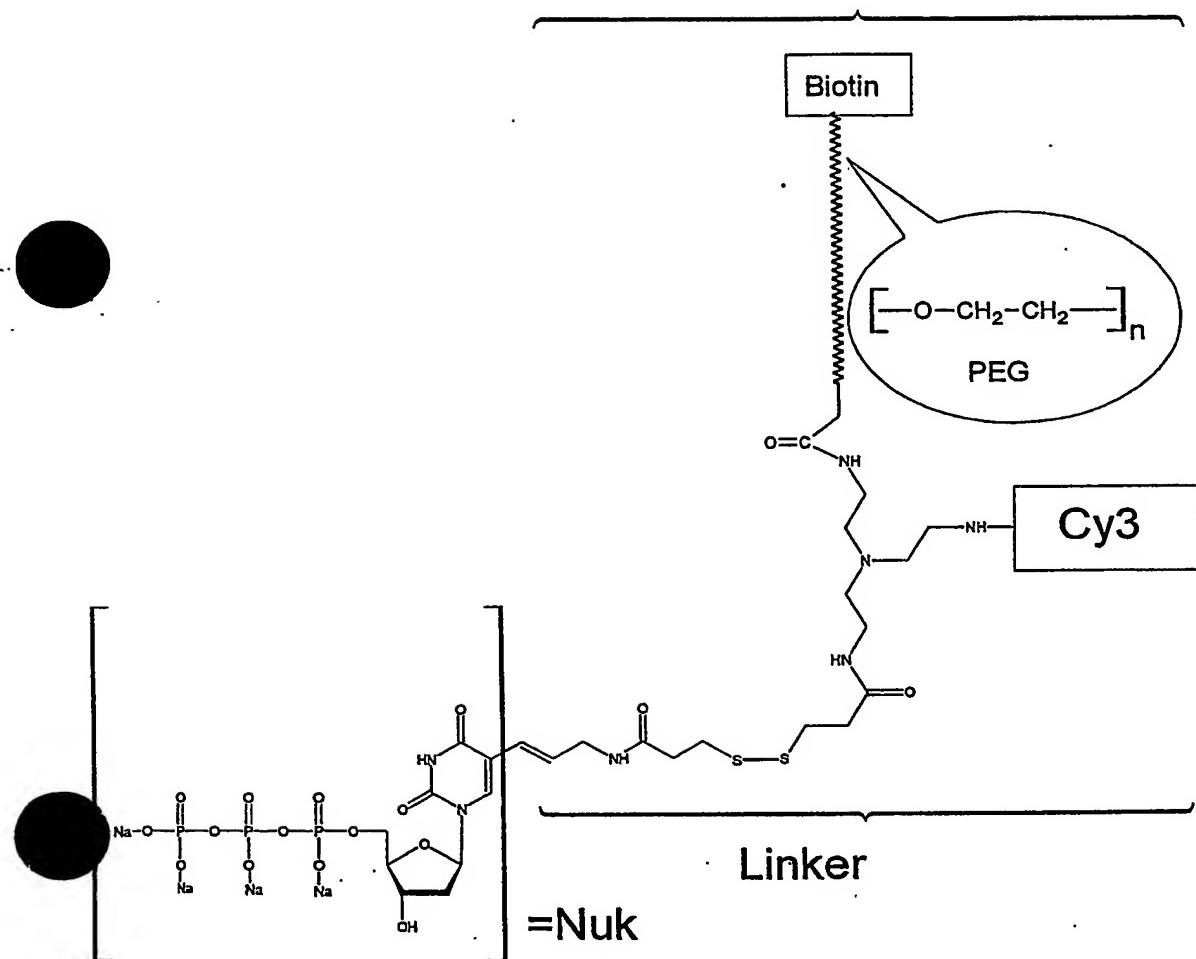


Fig. 31

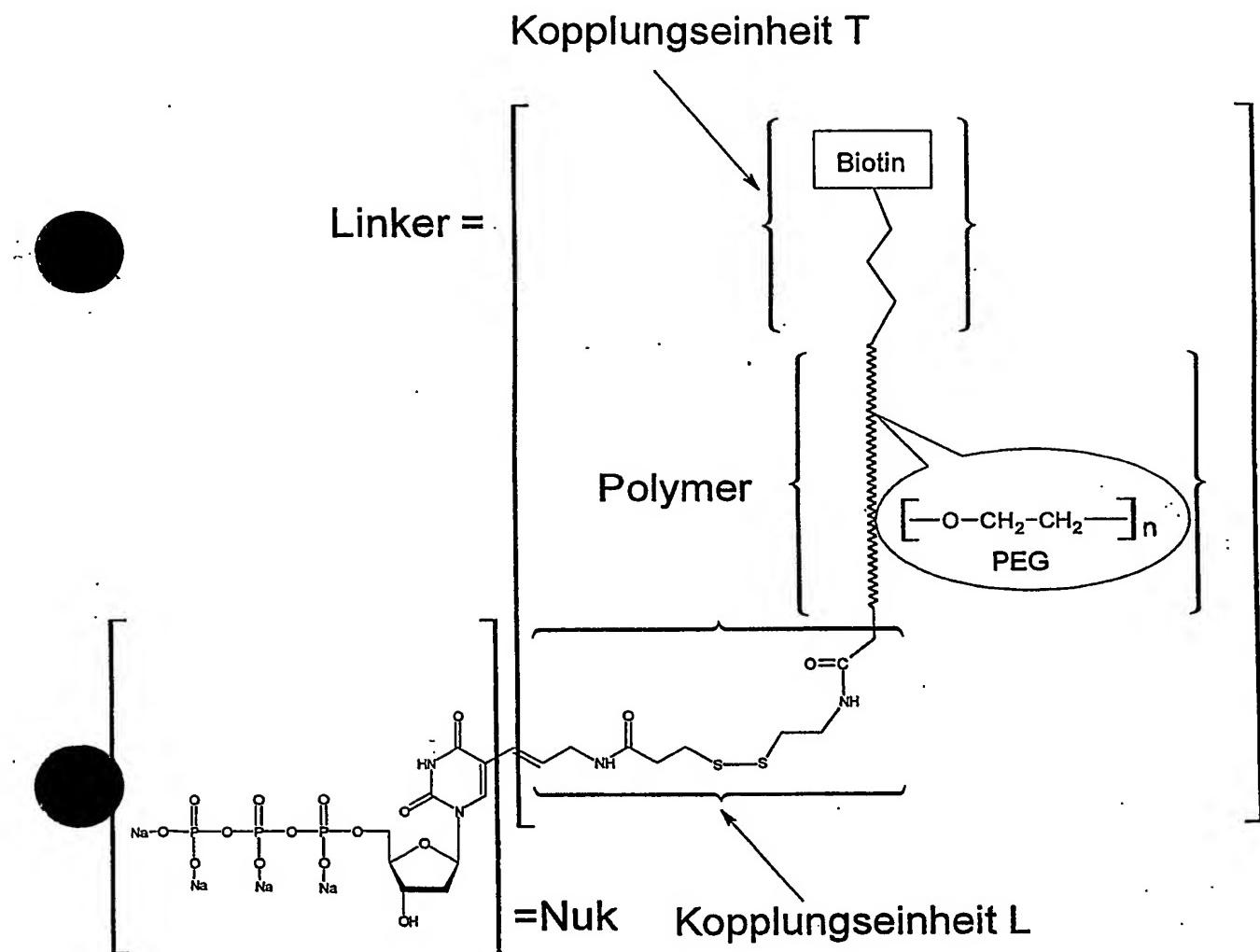
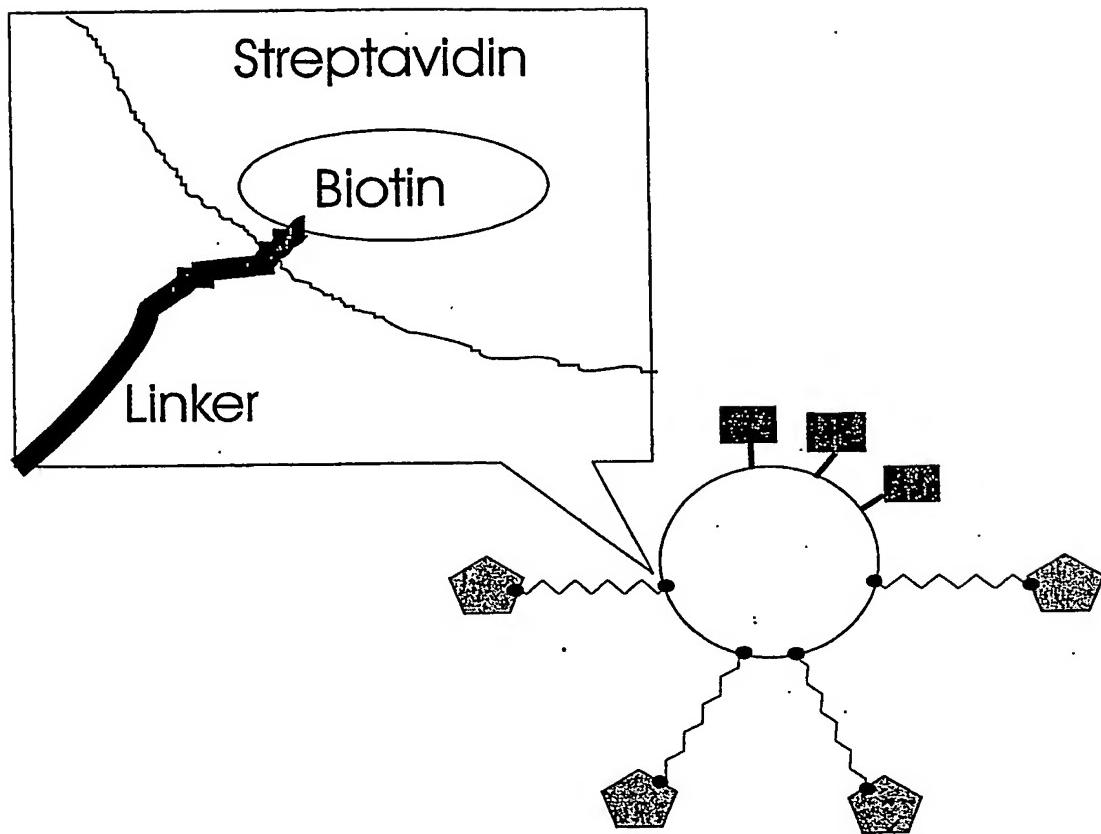


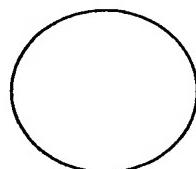
Fig. 32



Legende:

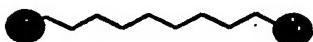


dUTP als  
Nuk-Komponente



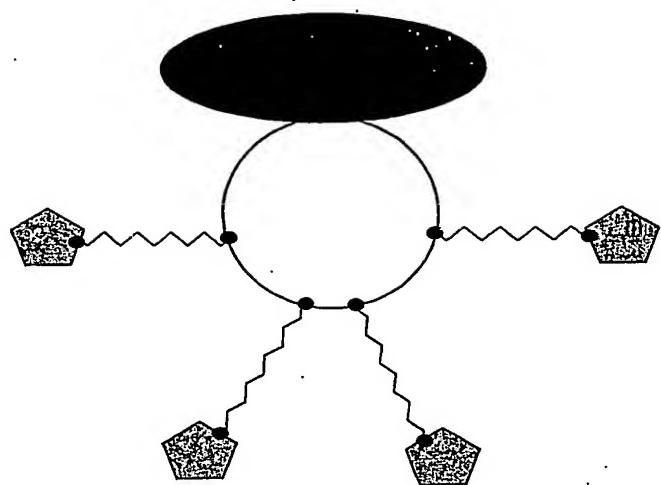
Fluoreszenzfarbstoffe

Strepavidin als  
Marker-Komponente



Linker-Komponente

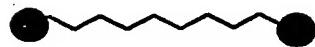
Fig. 33



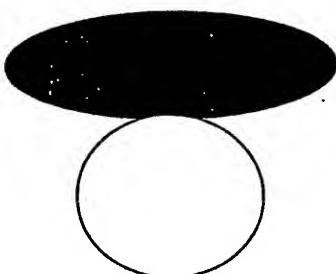
Legende:



dUTP als  
Nuk-Komponente

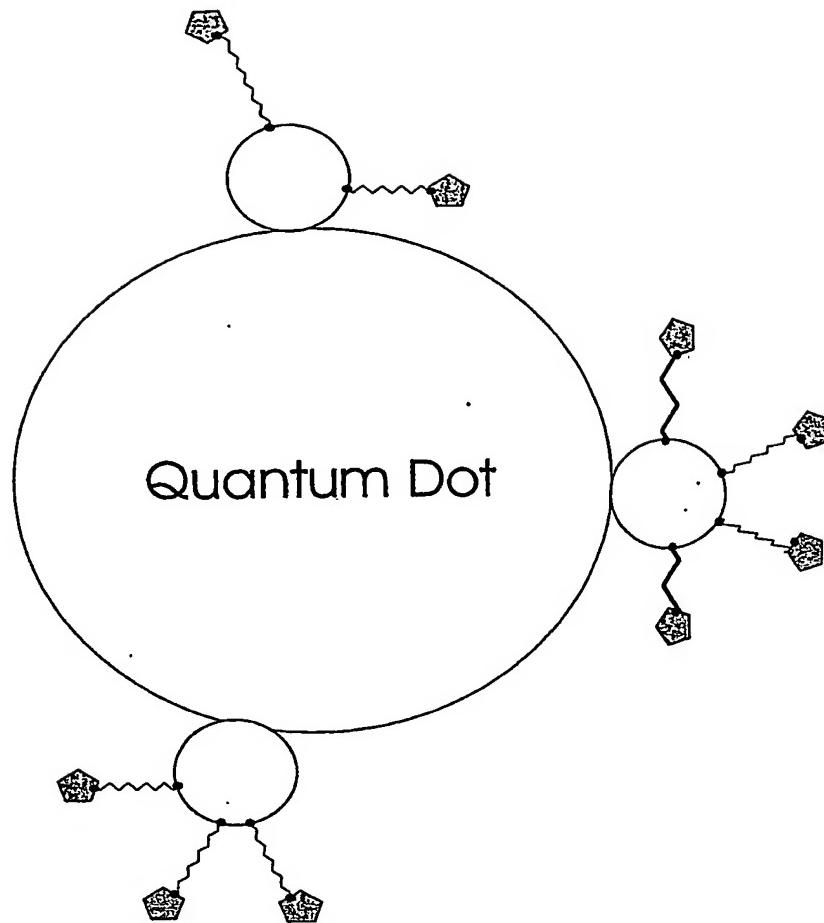


Linker-Komponente



Strepavidin-Enzymkonjugat  
als Marker-Komponente

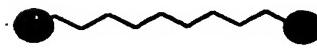
Fig. 34



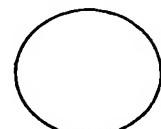
Legende:



dUTP als  
Nuk-Komponente



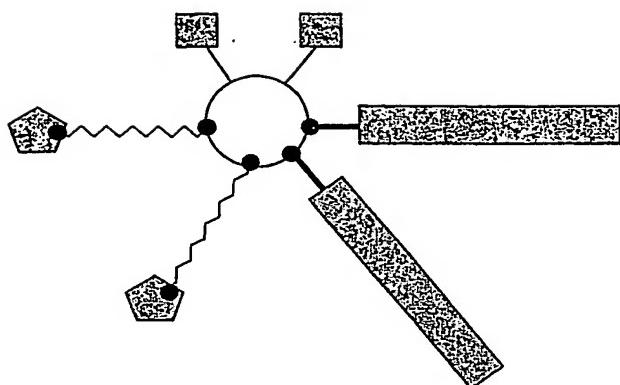
Linker-Komponente



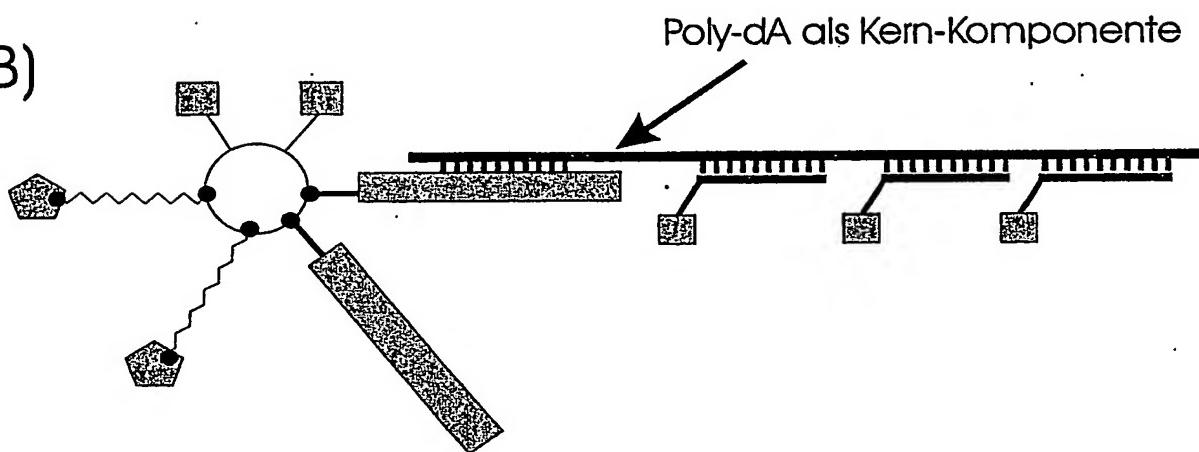
Strepavidin gekoppelt an  
Quantum Dot

Fig. 35

A)



B)



Legende:



dUTP als  
Nuk-Komponente



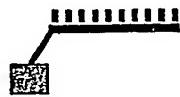
Streptavidin-Oligonucleotid  
als Marker-Komponente



Fluoreszenzfarbstoffe

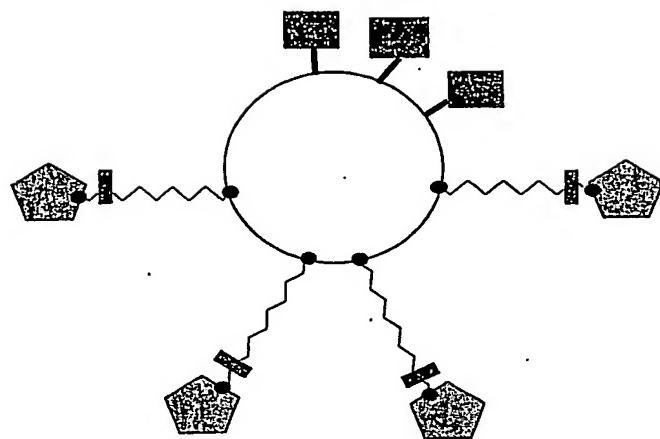


Linker-Komponente



markiertes Oligonukleotid  
als Marker-Einheit

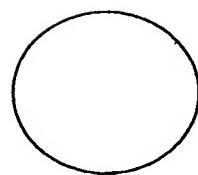
Fig. 36



Legende:



dUTP als  
Nuk-Komponente



Fluoreszenzfarbstoffe

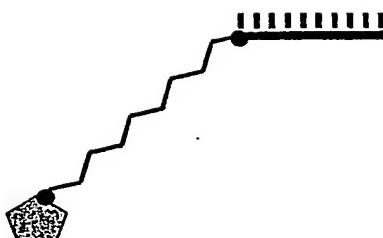
Strepavidin als  
Marker-Komponente



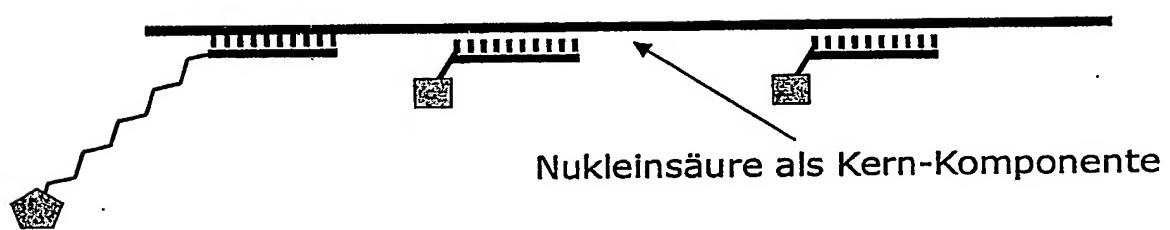
Linker-Komponente mit  
einer spaltbaren Verbindung

Fig. 37

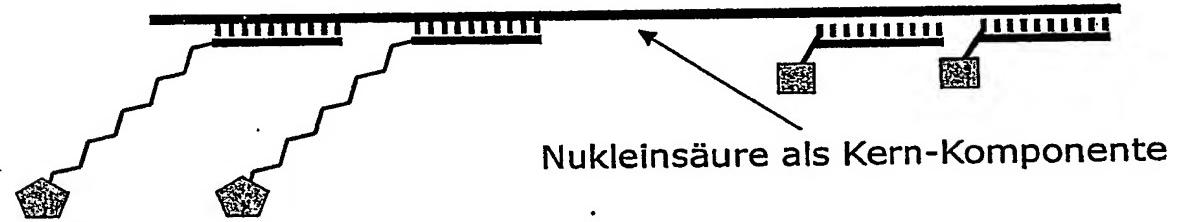
A)



B)



C)



Legende:



als Nuk-Komponente dCTP



Oligonukleotid dT30



Linker-Komponente

Fig. 38

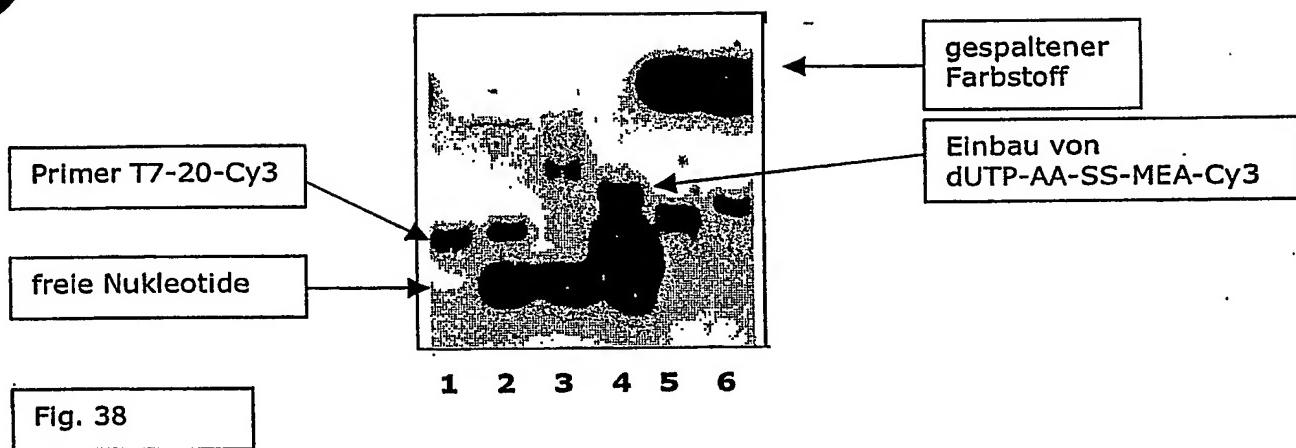


Fig. 39

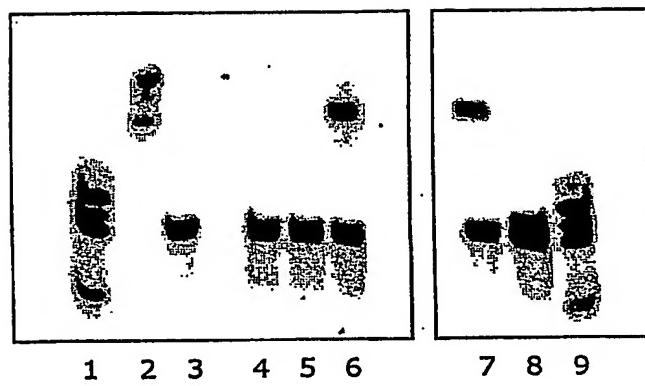


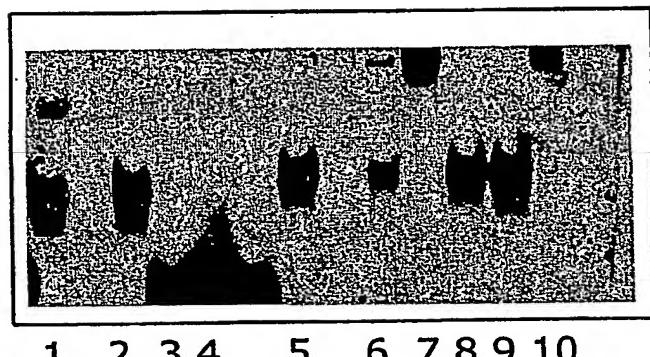
Fig. 39

Fig. 40



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Fig. 41



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**